

**A tumorsejtek által kiválasztott galektin-1 T-sejtekre
kifejtett apoptotikus hatásának mechanizmusa**

Ph.D. értekezés

Kovács-Sólyom Ferenc

témavezető: Monostori Éva, Ph.D., D.Sc.

MTA Szegedi Biológiai Központ, Genetikai Intézet
Limfocita Szigénál Transzdukciós Laboratórium

Biológia Doktori Iskola
SZTE TTIK, Szeged

2009.

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	4
A galektin-1, mint immunszuppresszív fehérje	4
<i>Szerkezet, expresszió</i>	4
<i>A galektin-1 funkciói</i>	5
<i>Adhéziós folyamatok szabályozása</i>	5
<i>Az immunválasz szabályozása</i>	6
<i>Immunprivilegium kialakítása</i>	9
Apoptózis	9
Tumor immunszuppresszív stratégiák és metasztázis képzés	11
CÉLKITŰZÉSEK	14
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	15
Felhasznált sejtvonalak	15
A sejtfelszíni galektin-1 vizsgálata áramlási citometriával	15
Fluoreszcens és konfokális mikroszkópia	16
Apoptózis vizsgálat DNS tartalom mérés alapján	17
A galektin-1 internalizációjának vizsgálata	17
SDS gél-elektroforézis, Western blot analízis	18
HeLa és U87 sejtek transzfekciója	19
Immunhisztokémia	19
Kaspáz 3 aktivitás kimutatása	20
Pufferek, oldatok	21
EREDMÉNYEK	23
A kísérleti rendszer beállítása, optimalizálása	24
A dolgozatban használt tumorsejtek jellemzése	25
A galektin-1 fehérjét expresszáló tumorsejtek T sejt apoptózist indukálnak	28
A ko-kultúra rendszerben bekövetkező T sejt apoptózist a tumorsejtek által termelt galektin-1 indukálja	30
A tumorsejt eredetű galektin-1 indukálta T sejt apoptózis mechanizmusa hasonló a rekombináns fehérje által elindított sejthaláléhoz	37
DISZKUSSZIÓ	43
ELÉRT ÚJ EREDMÉNYEK	49

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	50
BIBLIOGRÁFIA	51
A DISSZERTÁCIÓ ANYAGÁT ADÓ, VAGY AHHOZ KAPCSOLÓDÓ	
KÖZLEMÉNYEK	58
ÖSSZEFOGLALÁS	60

BEVEZETÉS

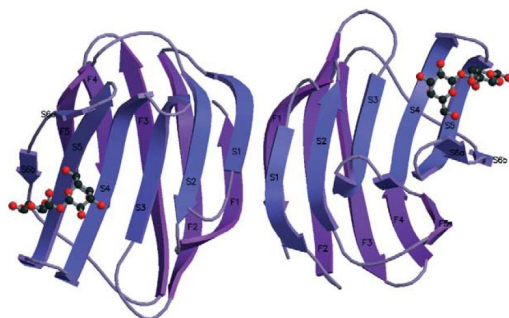
A galektin-1, mint immunszuppresszív fehérje

Szerkezet, expresszió

A galektin fehérjecsalád a lektinek közé tartozik, melyek legfőbb jellemzője, hogy szénhidrátkötő domainjük révén sejtfelszíni glikokonjugátumokhoz kötődnek. Ez idáig tizenöt különböző galektin molekulát azonosítottak. Az állatvilágban széles körben elterjedt fehérjék, gerinctelen (szivacsok, férgek) és gerinces állatokban (halak, kételtűek, madarak, emlősök) egyaránt előfordulnak (1;2).

A galektinek a citoplazmában, szabad riboszómákön szintetizálódnak majd a szignál szekvencia hiánya ellenére szekretálódnak egy úgynevezett nem klasszikus úton, azaz nem az endoplazmatikus retikulum – Golgi rendszer – exocitózis útvonalon keresztül (3;4). A szekréció mechanizmusa nem ismert, irodalmi adatok arra utalnak, hogy a szekrécióhoz szükséges a sejtfelszíni molekulák glikoziláltsága (5). Valószínűleg a sejtfelszínre transzlokálódó glikozilált molekulák „magukkal viszik” a galektineket. A szénhidrát kötő képességüknek köszönhetően a szekréciót követően a sejtfelszíni fehérjék és az extracelluláris molekulák oldalláncaihoz kötődnek, így autokrin, parakrin módon fejtik ki különféle hatásukat.

Ezen család legkorábban felfedezett és legjobban jellemzett tagja a galektin-1, amely egy 14kDa molekulatömegű, egy szénhidrátkötő domainnel rendelkező, globuláris fehérje. A galektin-1 az ideg- és izomszövetben, vesében, tüdőben, méhlepényben, az elsődleges (tímusz, csontvelő) és másodlagos (lép, nyirokcsomók) limfoid szervekben termelődik (6). Dimerizációs domainje homodimer kialakítását teszi lehetővé.



1. ábra A galektin-1 homodimer röntgen krisztallográfiás képe. A két szénhidrátkötő zsebben laktóz molekula látható.

A sejtfelszíni, valamint az extracelluláris mátrixban előforduló glikozilált fehérjékhez kötődve, a molekula befolyásolja a sejtadhéziót (7-9), valamint szignál transzdukciós utakat indít be.

A galektin-1 funkciói

A galektin-1 fehérjének számos különböző funkcióját azonosították, melyek az izom- és idegszövet regenerációjával (10), valamint az immun-homeosztázis szabályozásával kapcsolatosak. A szervezetben immunprivilegizált (az immunrendszertől elzárt) területek fenntartásában játszik szerepet például a szemben, reproduktív szervekben vagy a placentában. Egérgísérletekben kimutatták a szaglóidegek, axonok fejlődésének serkentésében betöltött szerepét is (11). Gyulladáscsökkentő hatása is ismert, ami abban nyilvánul meg, hogy az immunválaszt a T_H2 sejtek aktiválódása felé tolja el, ami a citokin termelés megváltozásával jár együtt (12).

Egészséges szervezetben finom szabályozó szerepet tölt be, fontosságát pathológiás körülmények között tapasztalhatjuk igazán. Hiányában, vagy működésének zavara esetén az immunreguláló szerepe megszűnik, vagy korlátozott, így krónikus gyulladás lép fel például psoriasis, illetve rheumathoid arthritis esetén. Túlműködése rákos megbetegedéskor veszélyes, hiszen ekkor az immunreguláló funkció felerősödik, így a tumor progressiója gyorsabb lesz.

Adhéziós folyamatok szabályozása

A sejtek kapcsolódása a bazális laminához, illetve az extracelluláris mátrixhoz (ECM) sok különböző faktor eredménye, fontos szerepet játszanak a sejtfelszíni adhéziós molekulák, valamint az ECM fehérjéi. Ezeken a molekulákon számos glikozilált oldallánc található, így a galektin-1 szénhidrátkötő és dimerizációs képességének köszönhetően befolyásolja az adhéziós folyamatokat. E tulajdonsága révén segíti a tumorsejtek migrációját és az ér endothélen való átjutását, ezzel együtt az áttétképzést. A galektin-1 részt vesz például a melanoma sejtek és az ECM laminin kölcsönhatásában (13), az ovárium karcinóma sejteknek a lamininhez és

fibronectinhez történő tapadásában (14), tumor sejtek és az endotélium kapcsolódásában (15).

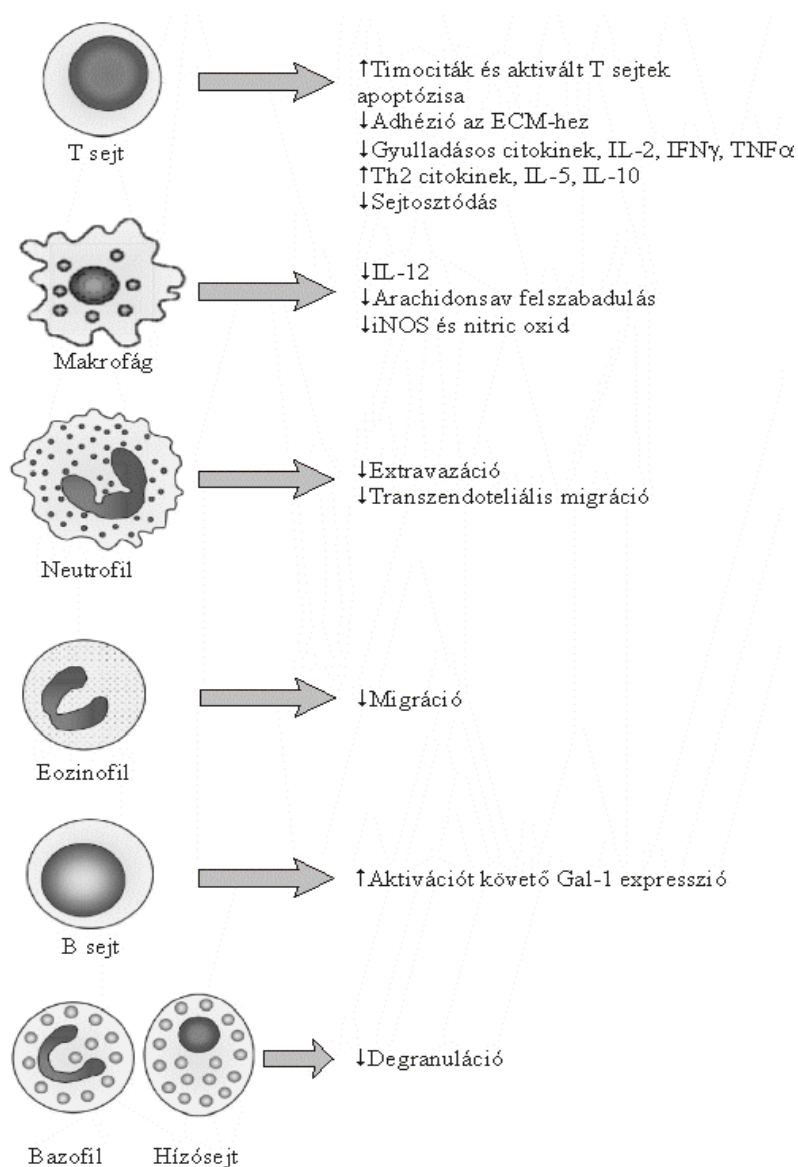
Az adhéziót pozitív és negatív irányban is befolyásolhatja az ECM fehérjék, laminin (16) és fibronectin (17), poli-N acetil-laktózin láncaihoz való kapcsolódásával. Ezzel összefügg az izom differenciáció, illetve regeneráció során betöltött szerepe. A mioblasztok nagy mennyiségű galektin-1-et tárolnak a citoplazmában. Miotubulusokká történő alakulásuk során a galektin-1-et az extracelluláris térbe szekretálják, ahol a lektin lefedi mind az izomdifferenciálódásban legfontosabb szerepet játszó ECM fehérjét, a laminint (18-21), mind annak receptorát, az $\alpha 7\beta 1$ integrint (22;23). Ezáltal gátolja az izomsejtek ECM-hez történő kapcsolódását és elősegíti a miotubulusokká való fúziót. Ebben az esetben tehát a Gal-1 anti-adhéziós szerepet tölt be. A szaglóideg sejtek axon növekedésében ellentétes, pro-adhéziós a szerepe: az integrin és laminin keresztkötésével erősíti az idegsejtek és ECM kölcsönhatását és ezáltal az axon növekedést segíti (24-26).

Az immunválasz szabályozása

Csoportunk érdeklődésének fókuszában a fehérje immunválaszt reguláló aktivitása áll. Irodalmi adatok és saját kísérletek is igazolják, hogy az aktivált perifériás T sejtekhez, vagy a hasonló fenotípusú leukémiás T sejtekhez –amelyeket kísérleteinkben modellként használunk- adott rekombináns galektin-1 a sejtek programozott halálát (apoptózis) indukálja. Korábbi munkáinkban leírtuk a rekombináns galektin-1 által indított programozott sejthalál legfőbb lépéseit T sejtekben (27;28).

A galektin-1 *in vivo* is szerepet játszik a timociták, valamint az aktivált T és B sejtek apoptózisának indukciójában. Az immunválasz szabályozásában létfontosságú feladata van a regulátoros T sejteknek (Treg), amelyek az aktivált T sejtek eliminálását végzik, azok programozott sejthalálának elindítása révén. Ezen aktivitásukat az általuk termelt galektin-1 fehérjén keresztül valósítják meg (29). Számos egyéb sejt típusra is hatással van a galektin-1. Gátolja a neutrofil granulociták kemotaxisát és az ereken keresztül történő átjutást (30). A Gal-1 szerepet játszhat az allergiás folyamatokban is. Gátolja az eozinofil granulociták migrációját *in vitro* (31) és a hízó sejtek degranulációját akut gyulladásban (32).

A Gal-1 csökkenti a makrofágok gyulladásos reakcióit is, így az arachidonsav (33) és prostaglandin E2 felszabadulást (34), az indukálható nitrogén monoxidáz (iNOS) aktivitását (35) és ezáltal a nitrogén monoxid (NO) termelést (36;37). A citokin mintázat az immunválasz során alapvető szabályozó faktor. Az előzőek alapján nem meglepő, hogy a galektin-1 hatással van erre a mintázatra, úgy, hogy a gyulladásos citokinek felszabadulását gátolja. Vírus fertőzés során a Gal-1 a dendritikus sejtek IL-6 termelését fokozza (38). A Th1 sejtek által termelt $\text{TNF}\alpha$ (39;40), $\text{IFN}\gamma$ (41-44), IL-2 (45-47) felszabadulás csökkenése mellett a Th2 citokinek, az IL-5 (48) és IL-10 (49) szintje növekedik, ezáltal az immunválasz a Th1-től a Th2 felé tolódik el. Ezeket a funkciókat a 2. ábra összegzi.



2. ábra A galektin-1 hatása a különböző fehérvérsejtek funkciójára

A galektin-1 hatásait *in vivo* nagy valószínűséggel szilárd fázishoz (sejtmembránhoz vagy extracelluláris mátrixhoz) kötötten fejti ki. Szérumban való előfordulásáról ez idáig két közlemény jelent meg, amelyek közül azonban az egyik inkább fej-nyak karcinóma diagnosztikában markerként való felhasználásának lehetőségét taglalja (50), a másik szerint a galektin-1 segíti a HIV T sejthez való asszociációját (51). *In vitro* kísérletek viszont bizonyítják, hogy a rekombináns galektin-1 az extracelluláris mátrixot modellező fehérjekeverékhez (Matrigel) kötve is indukál T sejt apoptózist (52), ami jól reprezentálja, hogy *in vivo* hogyan hathat.

Immunprivilegium kialakítása

A szervezetben előfordulnak speciális régiók, amelyek az immunrendszertől elzártan fejlődnek. Ezeknek az úgynevezett immunprivilegizált helyeknek a mikrokörnyezete védve van az immunrendszer esetleges támadásaitól. Ilyen terület például a szem és a reproduktív szervek (53;54). Terhesség esetén a magzatot is védeni kell az anya immunrendszerének reakciójától. Ezekben a folyamatokban központi szerepet játszik a galektin-1. Leírták a fehérje expresszióját a placentában (55), egérikísérletekben igazolták a galektin-1 funkcióját az anya magzat elleni immunválaszának repressziójában (56).

A tumorok fejlődésekor is fontos lépés az immunválasz kivédése. Ennek érdekében számos különböző –az alábbiakban részletezett- immunszuppresszív folyamat indul be. Kimutatták, hogy a rosszindulatú sejtek által kialakított immunprivilegium fenntartásában fontos a galektin-1 jelenléte is. Sok esetben a protein expressziója nem csak a tumorsejtekben, hanem a daganat körüli sztrómában (is) kimutatható (57-61). A tumorszövetben képződő erek endothel sejtjei is termelhetnek galektin-1-et, így a protein meggátolja a tumorspecifikus T sejtek infiltrálódását a szövetbe.

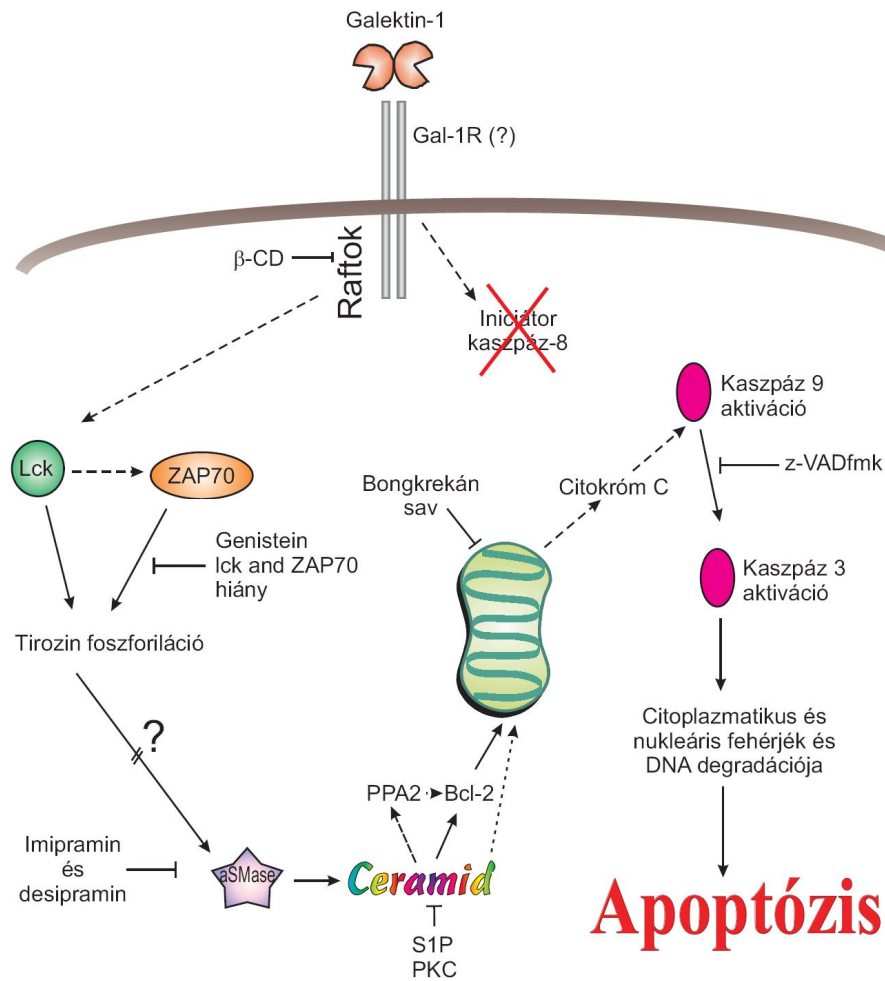
Apoptózis

A szervek, szövetek méretének és a szervezet homeosztázisának fenntartásához elengedhetetlen a feleslegessé vált, elöregedett, fertőzött vagy potenciális veszélyt

jelentő sejtek öngyilkossága és eltávolítása. Ezen sejtek alkotói a programozott sejthalál során lebomlanak és membránnal határolt vezikulákba csomagolódnak, melyeket a szomszédos sejtek fagocitálnak. Ez a folyamat az apoptózis, ami a szervezetben fiziológias körülmények között is folyamatosan zajlik. Működési defektusa súlyos betegségekhez vezethet. Túlzott jelenléte például neurodegeneratív betegségekben fordul elő (62), az apoptózis elmaradása, kivédése a rosszindulatú sejtek kialakulásának mérföldköve, illetve ez a képesség megnehezíti a tumorelles kezelést.

Az apoptózis két fő típusa a molekuláris mechanizmus alapján a receptor mediált és mitokondrium által mediált útvonal. A két szignál transzdukciós folyamat között átfedés is lehetséges. Az apoptózisról általában elmondható, hogy fontos szerepet játszanak tipikusan megjelenő/aktiválódó iniciátor és effektor molekulák. A halálligand receptorához való kötődésekor bekövetkező receptor trimerizáció például az iniciátor kaspáz-8 aktiválódásához vezet, amely viszont a mitokondrium mediálta szignál transzdukcióban nem történik meg. Ebben az esetben a kaspáz-9 aktiválódik, így ezen a szinten lehetséges a két útvonal egyértelmű elkülönítése. A mitokondrium az apoptózisnak ebben a típusában központi szerepet játszik. A mitokondrium membránjában található pro-apoptotikus fehérjék, amelyek a Bcl-2 család tagjai (pl. Bax, Bak), a membrán potenciál csökkenés hatására csatornát képeznek a membránon, így az egyébként a légzési lánc tagjaként funkcionáló citokróm c kijut a citoplazmába és ott az apoptoszóma kialakításában vesz részt, mely a kaspáz 9 aktiválódását eredményezi. Az említett Bcl-2 fehérjecsalád bizonyos tagjai anti-apoptotikus hatásúak (pl. maga a Bcl-2), ezek mennyiségének csökkenése mutatható ki apoptózis során. A kaspázok az apoptotikus folyamatok kulcsenzimeik, a folyamat elindulásakor az iniciátor kaspázok hasadása/aktivációja a további kaspáz enzimek hasítás általi aktivációját eredményezi (63).

Az apoptózis egyes jellemző lépései nyomon követhetők a galektin-1 által T sejtekben indukált folyamat során (64;65), ahogyan a 3. ábra is mutatja.



3. ábra A rekombináns galektin-1 által indukált T sejt apoptózis molekuláris mechanizmusa. A T sejteken levő specifikus receptor egyelőre ismeretlen, a szaggatott vonallal jelzett nyilak feltételezett lépéseket jelölnek, a folytonos vonal nyomán a kísérletekkel bizonyított folyamat követhető.

A fehérje csak aktivált T és B sejteken okoz apoptózist, ami specifikus, ilyen sejteken jelen lévő receptor meglétét feltételezi. Ez a receptor ez idáig ismeretlen. A gal-1 kötődése valószínűleg a receptor oligomerizációját idézi elő, ami a sejtben elindítja az apoptotikus kaszkádot. Az intracelluláris $p56^{\text{lck}}$ és ZAP70 aktiválódása tirozin-foszforilációt eredményez, aminek következtében foszforilálódik többek közt a savas szfingomielináz is. Az aktivált enzim hasítja a szfingomielint, ennek eredményeképpen ceramid szabadul fel, ami ebben az esetben másodlagos jelátvivőként működik. A mitokondrium membránjának depolarizációját idézi elő, így a citokróm C kiszabadulhat a mitokondrium két membránja közötti térből. A citokróm

C az Apaf-1 fehérjével és a kaszpáz 9-cel az apoptoszómát képezve a kaszpáz 9 aktiválását segíti. A kaszpáz kaszkád utolsó lépéseként az effektor kaszpáz 3 aktiválódik, ami után a sejt fehérjeinek és DNS-ének degradációja következik.

Tumor immunszuppresszív stratégiák és metasztázis képzés

A szervezetben előforduló és folyamatosan képződő transzformált sejteket az immunrendszer felismeri és eliminálja. A specifikus antigéneket prezentáló tumorsejtek beindítják az immunválaszt és amennyiben az sikeres, nem alakul ki tumor. Pathológiás eset többek között akkor fordul elő, amikor a rosszindulatú sejtek képesek kivédeni az immunrendszer ellenük irányuló támadását. Ezt számos különböző módon megvalósíthatják, például az MHC molekula szintézisének felfüggesztésével (66), negatív szabályozó útvonalak beindításával, szupresszor sejtek aktiválásával, valamint citotoxikus faktorok termelésével (67). A folyamatban részt vevő molekulák hathatnak szolúbilis, illetve membrán-, vagy ECM-kötött formában.

A tumorsejtek termelik a CCL22 nevű kemokint, melynek hatására a regulátoros T sejtek, amelyek az immunválasz szupresszállásáért felelősek, a daganatba vándorolnak, így csökkentik az immunválaszt (68).

Számos immunszuppresszív faktor termelődését leírták különböző tumorsejtek esetében. Ilyen a TGF- β (transforming growth factor- β), ami egy pleiotrop hatású citokin, gátolja a T sejt aktivációt, proliferációt és differenciációt (69), illetve gátolja a citotoxikus T sejtek (cTL) antitumor aktivitását (70). A TGF- β mellett termelődhet még az interleukin-10 (IL-10) és a prosztaglandin E₂ (PGE₂), amelyek ugyancsak a tumorspecifikus immunválasz elleni védekezésben játszanak szerepet. A tumorsejtek kiválasztják a mikrokörnyezetbe az indolamin2,3-dioxigenáz (IDO) enzimet, ami a triptofán aminosav kinureninné történő bontását végzi (71). Ez egyrészt lokális triptofán depléciót eredményez, ami a T sejtekre káros, másrészt a kinurenin toxikus a T sejtekre, így az IDO hozzájárul az immunprivilegium kialakításához (72). Az említett, tumorsejtek által szekretált anyagok szolúbilis formában jutnak el a célsejtekhez. A rosszindulatú sejtek azonban a sejtfelszínükön is prezentálnak olyan molekulákat, amelyek a velük interakcióba lépő effektor T sejtek funkcióját gátolják. Ilyen sejtfelszíni fehérjék a CD80, CD86, amelyek a citotoxikus T sejtek felszínén lévő CTLA-4 (citotoxikus T limfocita antigén-4) receptornak ligandjai. A CTLA-4 a

T sejt aktiváció negatív regulátora (73), így tumorsejt általi aktiválódása része az immunszuppresszív stratégiának (74). Megtalálható még a tumorsejtek membránján a PD-L1 (programmed death receptor ligand-1) (75), ami a T sejteken előforduló PD-1 (programmed death-1) transzmembrán receptorral (76) kölcsönhatva a T sejtben aktiváció-indukálta sejthalált idéz elő. A tumorsejtek képesek a velük kölcsönható T sejtek apoptózisát közvetlenül indukálni. Kifejezik ugyanis a FasL (Fas ligand) (77) és a TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) (78) fehérjéket, amelyek a T sejten levő megfelelő receptorhoz, a Fas-hoz, illetve a TRAILR-hoz kötődve a T sejtben receptor mediált apoptózist indítanak el.

Hipotézisünk szerint a galektin-1 is a tumorszuppresszív faktorok széles skálájának ebbe a csoportjába tartozik.

A tumor progresszió során az immunválasz kivédésén kívül fontos tényező az áttétképzés. A metasztatizáló sejtek kiszakadnak a primer tumorból, elválnak az extracelluláris mátrixtól, ami normál esetben anoikiszhez vezet. Ennek elkerüléséhez, valamint az ér endothélen való átjutáshoz, a target szövetbe való invázióhoz a génexpressziós mintázat megváltozása, illetve különböző faktorok összehangolt aktiválódása szükséges. Ezek egyike az általunk vizsgált galektin-1 fehérje.

Számos különböző típusú és eredetű tumorsejt esetében (prostatarák (79), vastagbélrák (80), melanóma (81), glióma (82)) írták le a galektin-1 jelentős és konstitutív expresszióját. Irodalmi adatok igazolják, hogy a sejtadhéziós tulajdonságok befolyásolásával növeli a tumorsejtek mozgékonytását, migrációját (83) az extracelluláris mátrixban, valamint az érfalon keresztül, illetve az új szövetekben való megtapadásában fontos. Serkenti a tumor progresszióját és az áttétképzést (84), a galektin-1 expresszió a rákos betegségek rossz prognózisát mutatja (85). Mindezekon felül a galektin-1 erősen immunszuppresszív anyag, a tumorsejtek, illetve a tumor asszociált sztróma által kialakított immunprivilegium kialakításában is részt vesz (86;87). Továbbá a galektin-1 génje a tumoros transzformáció során is aktiválódhat, vagy a működése fokozódhat. Az egészséges melanociták például nem expresszálják, míg melanóma sejtekben a fehérje nagy mennyiségben jelen van. Egérkísérletek igazolják, hogy a B16 melanóma progresszivitásának meghatározásában a galektin-1-nek kulcsfontosságú szerepe van (88). A fejlődő primer tumor mérete egyre nő a betegség során. Ha eléri a körülbelül egy

köbmillimétert, a daganat belsejében levő sejtek már túl messze vannak a környező erektől, így hipoxiás állapotba kerülnek. A sejtpusztulás elkerülése érdekében új erek képzését indítják el (angiogenezis). Hipoxia hatására aktiválódik a galektin-1 (89) és az angiogenezist elősegítő faktorok termelődését serkenti, hozzájárul az új erek képződéséhez (90).

Ezekre a tényekre alapozva elmondhatjuk, hogy a galektin-1 a rosszindulatú sejtek központi, nagy jelentőségű molekulája, a különböző rákterápiás kezelések ígéretes célpontja lehet.

CÉLKITŰZÉSEK

Ismert, hogy a gal-1 erősen immunszuppresszív fehérje, a szervezetben immunprivilegizált területek fenntartásában játszik szerepet. *In vitro* adatok alátámasztják, hogy a gal-1 az aktivált T sejtek apoptózisát indukálja. Az irodalmi adatok elsősorban a rekombináns, oldatban alkalmazott gal-1 citotoxikus hatásáról adnak ismereteket. A gal-1 fiziológias hatása azonban sejt-sejt, vagy sejt-extracelluláris mátrix kölcsönhatása révén valósul meg, mivel a fehérje szekréció után azonnal a kiválasztó sejthez, vagy a közvetlen környezetében lévő ligandokhoz kötődik. Az így kiváltott T sejt apoptózis mechanizmusa nem ismert. Munkánkat az motiválta, hogy teljesebb képet kapjunk a gal-1 T sejtekre kifejtett fiziológias citotoxikus hatásáról, amely hozzájárul a természetes és patológias, tumorban kialakuló immunszuppresszióhoz. Ezért a következő feladatokat és kérdéseket fogalmaztuk meg:

- 1.) Célunk volt egy olyan *in vitro* modell kísérleti rendszer kidolgozása, mely lehetőséget ad a sejt-sejt kölcsönhatáson alapuló, gal-1 által kiváltott T sejt apoptózis mechanizmusának vizsgálatára
- 2.) Választ kerestünk arra, hogy a gal-1 fehérjét expresszáló tumorsejtek képesek-e kiváltani az aktivált T sejtek apoptózisát, hozzájárulva a tumorspecifikus immunválasz kivédéséhez
- 3.) Mivel a tumorsejtek számos T sejtekre ható gátló faktort termelnek, meg kívántuk határozni, hogy a tumorsejtek által termelt gal-1 részt vesz-e az apoptózis indukcióban
- 4.) Mi a tumorsejt eredetű gal-1 által kiváltott T sejt apoptózis mechanizmusa összehasonlítva a szolubilis gal-1 okozta sejthalállal

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Felhasznált sejtvonalak

A modellként használt Jurkat leukémiás T sejtvonalat 5% FCS-t (fetal calf serum) (Gibco) tartalmazó RPMI-1640 (pufferek, oldatok 1. pont) médiumban tartottuk. A JCaM1.6 és P116 (p56^{lck} illetve ZAP70 kináz hiányos T sejtvonalak) valamint az SKMEL-28 melanóma sejtvonalat 10% FCS tartalmú RPMI-1640 médiumban tenyésztettük. Az U87, Hs683 és U373 glioblasztóma, illetve a C32 melanóma sejtvonalakat 5% FCS, míg a HeLa méhnyakrák karcinóma sejteket és a HT144 glioblasztóma sejteket 10% FCS tartalmú MEM (Gibco) médiumban tartottuk. A sejtvonalakat 37°C-os inkubátorban 5% CO₂ koncentráció mellett tenyésztettük. A ko-kultúra kísérleteket MEM médiumban 5% FCS tartalom jelenlétében végeztük.

A P116 sejtvonalat R.T. Abraham professzortól (Mayo Clinic, Rochester) (91), a JCaM1.6 sejteket A. Weisstől (Howard Hughes Medical Institute, San Francisco, USA) (92) kaptuk.

T sejteket egészséges donor perifériás véréből (Peripheral mononuclear cells, PBMC) izoláltuk. A vérmintát Ficoll Paque™ Plus (Amersham Biosciences) gradiensre rétegezve 900 g fordulaton centrifugáltuk 30 percig. A mononukleáris sejteket 10% FCS tartalmú RPMI médiumban 5µg/ml phytohemagglutinin-M-mel (PHA) (Calbiochem) aktiváltuk. Hetvenkét óra után friss, 20 ng/ml interleukin-2-vel (IL-2) (Chiron, Harefield) kiegészített médiumban tenyésztettük tovább a sejteket. A ko-kultúra kísérletek előtt 24 órával a sejtenyésző médiumot IL-2 mentesre cseréltük.

A sejtfelszíni galektin-1 vizsgálata áramlási citometriával

A sejteket (2×10^5 sejt/minta) immunfluoreszcencia (FACS) pufferben (pufferek, oldatok 4. pont) szuszpendáltuk. A galektin-1 kimutatásához egér eredetű humán galektin-1 elleni monoklonális ellenanyagot (laboratóriumunkban készült, 2C1/6 klón) használtunk 5µg/ml koncentrációban. 45 perc jégen történő inkubáció után kétszer mostuk 1-1 ml immunfluoreszcencia pufferrel. A másodlagos ellenanyagot

(anti-egér IgG, ATTO fluorokrómmal konjugálva, Sigma) 1:100 hígításban használtuk és 30 percig jégen inkubáltuk a sejteket. Mosás után 300 µl immunfluoreszcencia puffert adtunk a mintákhoz és a mérést FacsCalibur (Becton Dickinson) készülékkel végeztük FL-1 csatornában. Az elpusztult sejteket 10 µg/ml propidium-jodid jelöléssel különítettük el FL-3 csatornában. Az eredményt CellQuest™ software-rel értékeltük ki. A mérési eredményből összevethető értékeket számoltunk a következő, a módszer során általánosan használt képlet segítségével:

$$\text{fluoreszcencia jel} = 10^{\{(Ch\# \text{ minta} - Ch\# \text{ kontroll})/64\}},$$

ahol „Ch# minta” a vizsgált minta, „Ch# kontroll” pedig a jelöletlen minta fluoreszcencia intenzitás átlaga csatornaszámban kifejezve. Az így kapott relatív fluoreszcencia értékeket néhány esetben oszlopdiagramon ábráztuk.

A sejtfelszíni galektin-1 eltávolítását thiodigalaktóziddal (TDG) (Sigma) végeztük, amelyet 100 mM koncentrációban alkalmaztunk. 30 perc jégen történő inkubáció után a sejteket PBS-sel (pufferek, oldatok 3. pont) mostuk, majd a fent említett protokoll szerint elvégeztük a jelölést és a mérést.

A kísérletek során felhasznált rekombináns galektin-1 fehérjét laboratóriumunkban állítjuk elő korábban publikált protokoll alapján (93).

Fluoreszcens és konfokális mikroszkópia

U87, C32, SKMEL-28 vagy HeLa sejtet (10^4 sejt/minta) 12 mm átmérőjű kerek üveg fedőlemezre növesztettünk. A mintákat 24 lyukú szövettenyésztő lemez egy-egy edényébe helyeztük. A T sejtek magját 100 ng/ml koncentrációjú Hoechst33342 (Sigma) festékkel megjelöltük (30 perc, 37°C). A felesleges festéket kimosva a jelölt T sejteket (2×10^5 sejt/minta) 400 µl térfogatban az adherens sejtekhez adtuk. A fedőlemezeket 16 óra inkubáció után kiemeltük, majd a mintákat 4% paraformaldehiddel (Sigma) 4 percig fixáltuk szobahőn. A PBS-sel történő mosás után az üveglap fehérjekötő helyeinek telítése érdekében a mintákat 1 órát inkubáltuk immunfluoreszcencia pufferrel. A galektin-1 kimutatásához az áramlási citometriás kísérletekhez használt ellenanyagot használtuk ugyanabban a hígításban. 45 perc után a mintákat Annexin V kötő pufferrel (pufferek, oldatok 5. pont) mostuk kétszer. A másodlagos ellenanyagot, anti-egér IgG NL557 fluoreszcens festékkel konjugálva

1:200 hígításban (R&D Systems) és az AlexaFluor488 fluoreszcens festékkel konjugált AnnexinV (Molecular Probes) molekulát 1:20 hígításban Annexin kötő pufferben együtt adtuk a mintákhoz és 30 percig inkubáltuk. Ezután a pufferrel mostuk a mintákat, majd a lemezeket a felesleges puffer leitatását követően FluoromountG (Southern Biotech) használatával tárgylemezre rögzítettük. Száradás után a lemezeket körömlakkal leszigeteltük és a szennyeződések desztillált vizes mosással eltávolítottuk.

A mitokondrium depolarizációjának kimutatására JC-1 (Fluka) festéket használtunk. A molekula monomer állapotban gerjesztésre zöld jelet ad, az egészséges mitokondriumokban akkumulálódva piros szín jelenik meg. A csökkent membránpotenciállal rendelkező mitokondriumokat tartalmazó apoptotikus sejtekben tehát csak a zöld szín látható, az egészséges sejtekben piros szín is megfigyelhető.

A mintákat OlympusFV1000 konfokális mikroszkóppal, illetve Zeiss AxioScope fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

A transwell kísérleteket 0,3 µm pórusátmérőjű féligáteresztő hártyával rendelkező inszertek (Corning) használatával végeztük.

Apoptózis vizsgálat DNS tartalom mérés alapján

A 100 µg/ml rekombináns galektin-1-gyel kezelt, illetve a tumor sejtek koncentrált médiumában 24 óráig 37°C-on tartott T sejteket PBS-sel mostuk, majd DNS-festő pufferben felfuszpendáltuk. Az RNáz enzim megemésztette a sejtekben levő RNS-t, így a propídium-jodid csak a DNS-t jelölte. Az apoptotikus sejtek DNS állománya fragmentálódik és vezikulákba csomagolódik. A permeabilizált sejthártyán ezek a vezikulák távoztak, így a sejt DNS tartalma csökkent. A sejtciklus analízis során ezek a sejtek az egészséges, normál DNS tartalmú, G1 fázisban levő sejt populáció előtt jelentek meg, ezért az apoptotikus sejtek ebben az úgynevezett subG1 fázisban találhatók. A méréseket FACS Calibur (Becton Dickinson) készülékkel végeztük FL-3 csatornában, az eredményt CellQuestTM software-rel értékeltük ki.

A galektin-1 internalizációjának vizsgálata

A HeLa sejtekhez 25 µg/ml galektin-1 fehérjét adtunk. Bizonyos ideig tartó inkubáció után, illetve kontrolként azonnal a sejteket fixáltuk, majd a fentebb említett

anti-galektin-1 elsődleges és a FITC-cel konjugált másodlagos ellenanyagot használva megjelöltük a sejtfelszíni galektin-1-et. A galektin-1 lokalizációjának megállapítása érdekében a HeLa sejtekhez FITC-jelzett galektin-1-et adtunk és a felesleges fehérje kimosása után a mintákat OlympusFV1000 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

SDS gél-elektroforézis, Western blot analízis

A sejteket (2×10^5 sejt/minta) lízis pufferben (pufferek, oldatok 13. pont) tártuk fel, a sejtmagokat és törmeléket 16000 g centrifugálással eltávolítottuk. A sejtlizátumot ugyanakkora mennyiségű, kétszeres töménységű redukáló SDS mintapufferrel (pufferek, oldatok 6. pont) elegyítettük és 12%-os SDS poliakrilamid gélre (pufferek, oldatok 7-8. pont) vittük fel. A fehérjék méret szerinti szétválasztása után a mintákat elektromos árammal transzfer pufferben (pufferek, oldatok 11.) nitrocellulóz membránra (Schleicher & Schuell GmbH, Németország) transzferáltuk. A membrán szabad kötőhelyeit 3% zselatinnal (TBS-Tweenben, pufferek, oldatok 12. pont) 1 órán át szobahőn telítettük. A galektin-1 kimutatásához a laboratóriumunkban készített egér eredetű humán galektin-1 elleni monoklonális ellenanyagot (3C1/A1 klón) használtunk 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban. Felviteli kontrollként β -aktint felismerő nyúl eredetű ellenanyagot alkalmaztunk (Ab9227-50 Abcam) 1:10000 hígításban. A membránt TBS-Tween (pufferek, oldatok 12. pont) oldattal mostuk háromszor, majd tormagyökér peroxidáz enzimmal konjugált anti-egér IgG és anti-nyúl IgG ellenanyagokat (Dako) használtunk. A membránt ECL Plus (GE Healthcare Amersham™) oldattal hívtuk elő AGFA röntgen filmet exponálva. A gélben maradt fehérjéket Coomassie festékes oldattal (pufferek, oldatok 10. pont) festettük és tettük láthatóvá.

A szemi-kvantitatív Western blot során a vizsgálandó sejtek lizátumával együtt ismert mennyiségű rekombináns galektin-1 fehérjét vittünk fel a gélre. A kísérlet végeredményét adó röntgenfilmet beszkeneltük, majd ImageQuant program segítségével megmértük az egyes csíkok denzitását. A kapott értékekből standard görbét készítettünk, amelyre a tumorsejtek adatait illesztve megkaptuk a minták galektin-1 tartalmát.

HeLa és U87 sejtek transzfekciója

A HeLa sejteket pcDNA3.1 vektorba ligált galektin-1 cDNS-sel, illetve üres plazmiddal transzfektáltuk.

Az U87 sejtekbe a galektin-1 messenger RNS-éhez hibridizáló RNS oligonukleotidokat kifejező plazmidokat juttattunk be. A pSUPERIOR-NEO (Oligoengine) plazmidok olyan DNS szakaszokat tartalmaztak, amelyekről a galektin-1 messenger RNS-ének két különböző régiójához hibridizáló RNS szakaszok szintetizálódnak. Az egyik 19 nukleotid hosszúságú fragment a gal-1 mRNS 120., a másik a 380. nukleotidjánál hibridizál, RNS duplexet hozva létre. A dupla szálú mRNS-t a sejtekben működő rendszer lebontja, így a transzláció gátolt. A vektorba épített konstrukciók a következők voltak:

Galec120siU:

5'-GAT CCC CAA CCT GTG CCT GCA CTT CAT TCA AGA GAT GAA GTG CAG GCA CAG GTT TTT TTA-3'

Galec120siL:

5'-AGC TTA AAA AAA CCT GTG CCT GCA CTT CAT CTC TTG AAT GAA GTG CAG GCA CAG GTT GGG-3'

Galec380siU:

5'-GAT CCC CCA AGA TCA AAT GTG TGG CCT TCA AGA GAG GCC ACA CAT TTG ATC TTG TTT TTA-3'

Galec380siL:

5'-AGC TTA AAA ACA AGA TCA AAT GTG TGG CCT CTC TTG AAG GCC ACA CAT TTG ATC TTG GGG-3'

Kontrollként ugyanezekből a nukleotidokból álló random szekvenciájú szakaszokat (scrambled-scr RNS) használtunk, amelyekről ellenőriztük, hogy nem kötődnek a sejtekben előforduló egyik mRNS-hez sem. A szekvenciák az alábbiak:

Galec120scU:

5'-GAT CCC CCG TAC ACA TAC TTG CGC TTT CAA GAG AAG CGCA AGT ATG TGT ACG TTT TTA-3'

Galec120scL:

5'-AGC TTA AAA ACG TAC ACA TAC TTG CGC TTC TCT TGA AAG CGC AAG TAT GTG
TAC GGG G-3'

Galec380scU:

5'-GAT CCC CAG GAC GTG CGC ACA TAT ATT TCA AGA GAA TAT ATG TGC GCA CGT
CCT TTT TTA-3'

Galec380scL:

5'-AGC TTA AAA AAG GAC GTG CGC ACA TAT ATT CTC TTG AAA TAT ATG TGC GCA
CGT CCT GGG-3'

A transzfekcióhoz mindkét esetben a $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ mediálta módszert választottuk a forgalmazó (Promega) által javasolt protokollt követve.

A felhasznált plazmidok neomicin rezisztencia gént hordoznak, így a stabil klónok szelekciójához 500 µg/ml G418-at (Sigma) használtunk.

Immunhisztokémia

A bőr- és glioblasztóma szöveti metszetek elkészítése a standard protokoll szerint történt (94). Az endogén peroxidáz aktivitás blokkolása érdekében a mintákat hidrogén-peroxid 0,3%-os metanolos oldatával inkubáltuk fél órát. Az antigén epitop hozzáférhetőségét hőkezeléssel érték el, ami a minták kuktában, nyomás alatt történő, 2 percre tartó hevítésével történt Tris-EDTA pufferben (10mM Tris, 1mM EDTA pH 9.0). A minták jelölése során egér monoklonális anti-galektin-1 ellenanyagot (Novocastra) használtunk 1:1000 hígításban. Kilencven perc inkubáció után EnVision+ (Dako) másodlagos ellenanyagot használtunk a gyártó utasítása szerint. A peroxidáz reakcióhoz DAB (diaminobenzidine) Substrate-Chromogen rendszert (Dako) alkalmaztunk. A metszeteket zselatinos glicerinnel fedtük be.

Kaspáz 3 aktivitás kimutatása

A ko-kultúra mintákat 24 óra inkubáció után fixáltuk 4% paraformaldehiddel 4 percre szobahőn. Szaponinos oldattal (pufferek, oldatok 14. pont) történő permeabilizálás és a telítés után az aktív, hasított kaspáz 3-at felismerő ellenanyagot százszoros hígításban (Beckton Dickinson) inkubáltuk a mintákkal 45 percre. Mosás után FITC-jelzett anti-nyúl IgG másodlagos ellenanyagot (Dako) használtunk, majd

30 perc inkubáció után a felesleges ellenanyagot kimosva a fedőlemezeket FluoromountG használatával tárgylemezre rögzítettük. A mintákat Zeiss Axioscope fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

Pufferek, oldatok

1. RPMI sejtenyésztő médium:

1,04% (w/v) RPMI 1640 por (Gibco BRL)
0,2% (w/v) NaHCO₃
10 NE/ml penicillin (Biogal Gyógyszergyár Rt.)
0,1 mg/ml streptomycin (Egis Gyógyszergyár Rt.)
sterilre szűrés után kiegészítve 0,63 mg/ml L-glutaminnal (Sigma) és
5% (v/v) vagy 10% (v/v) hőinaktivált magzati borjúsérummal (FCS, Protein GMK, Gödöllő)

2. Tripánkék oldat sejt számoláshoz:

0,16% (w/v) tripánkék
fiziológiás sóoldat

3. PBS, pH 7,4:

1,8 mM NaH₂PO₄
10 mM Na₂HPO₄
135 mM NaCl
3 mM KCl

4. FACS puffer:

PBS
1% (w/v) BSA (Sigma) vagy 1% (v/v) FCS (Protein GMK)
0,1% (w/v) nátrium-azid (Sigma)

5. Annexin V-kötő puffer:

10 mM HEPES pH 7,4
140 mM NaCl
2,5 mM CaCl₂

6. Redukáló SDS mintapuffer (kétszeres töménységű):

125 mM Tris/HCl pH 6,8
20% (v/v) glicerin
4% (w/v) SDS
2% (v/v) β-merkaptoetanol (Sigma)
brómfenolkék (Bio-Rad)

7. *Koncentráló gél:*

5% (w/v) akrilamid / 0,13% (w/v) bisz-akrilamid (Bio-Rad)
125 mM Tris/HCl pH 6,8
0,1% (w/v) SDS
0,033% (w/v) ammónium-peroxi-diszulfát (APS) (Sigma)
0,07% (v/v) N, N, N, N'-tetrametil-etilén-diamin (TEMED) (Bio-Rad)

8. *Elválasztó gél:*

7-15% (w/v) akrilamid/ 0,182-0,39% (w/v) bisz-akrilamid
125 mM Tris/HCl pH 8,8
0,1% (w/v) SDS
0,033% (w/v) ammónium-peroxi-diszulfát
0,07% (v/v) N, N, N, N'-tetrametil-etilén-diamin (TEMED)

9. *Futtató puffer:*

25 mM Tris/HCl pH 8,3
194 mM glicin
0,1% (w/v) SDS

10. *Coomassie Brilliant Blue G-250 fehérjeszeparáló gélek festéséhez:*

0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
50% (v/v) metanol
10% (v/v) ecetsav

11. *Transzfer puffer:*

25 mM Tris-HCl pH 8,3
194 mM glicin
20% (v/v) metanol

12. *TBS-Tween:*

10 mM Tris-HCl pH 7,5
150 mM NaCl
0,05% (v/v) Tween 20 (Sigma)

13. *Lízispuffer:*

10 mM Tris-HCl pH 8
150 mM NaCl
1% Triton X-100
0,5% nátrium-dezoxikolát
0,1% SDS
2mM EDTA
1mM PMSF

14. Szaponin:

0,2% szaponin
0,1% BSA
PBS-ben

15. DNS-festő puffer:

0,1% Triton X
0,1% nátrium-citrát
10 µg/ml RNáz
10 µg/ml propidium-jodid
PBS-ben

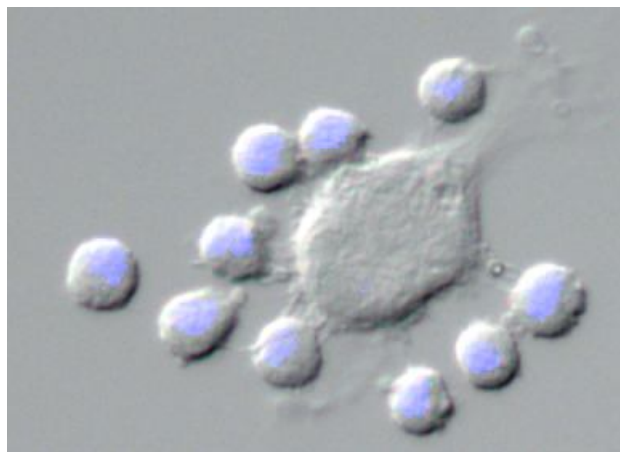
EREDMÉNYEK

A kísérleti rendszer beállítása, optimalizálása

Irodalmi adatok és csoportunk kísérleti eredményei alapján a következő munkahipotézist állítottuk fel:

Annak tudatában, hogy a szolúbilis rekombináns galektin-1 *in vitro* körülmények között T sejtek apoptózisát indukálja, feltételeztük, hogy a tumorsejtek által termelt és a sejtfelszínen prezentált galektin-1 fehérje is okozhatja T sejtek programozott halálát.

Ennek vizsgálatára egy *in vitro* rendszert dolgoztunk ki, melynek lényege, hogy az adott tumorsejtet és a modell T sejt-ként alkalmazott Jurkat T sejt-vonalat (melyről tudjuk, hogy érzékeny a galektin-1 által indukált apoptózisra) együttes kultúrában tartjuk (ko-kultúra, 4. ábra).



4.ábra A ko-kultúra során mikroszkópos analízissel megfigyelhető a két sejt-típus közötti kölcsönhatás. U87 glióma és Jurkat sejteket 16 órán át együtt tenyésztettük, majd fluoreszcens- és fénymikroszkóppal vizsgáltuk. A tumorsejtek (adherens, középen) és a T sejtek (kisebb, kerek sejtek) morfológiájuk alapján is megkülönböztethetők. A T sejtek magját előzetesen Hoechst33342 festékkal megjelölve (kék) és a fluoreszcens mikroszkópos képet a Nomarsky felvételre vetítve egyértelmű az elkülönítésük a gliómától.

A tumorsejteket 12 mm átmérőjű üveg fedőlemezre növesztettük, amit egy 24 lyukú sejtenyésző lemezbe helyeztünk. Előzetes próbák alapján az optimális sejtszámot 10^4 sejt/minta számban állapítottuk meg. A sejtek így 60-70% konfluenciát

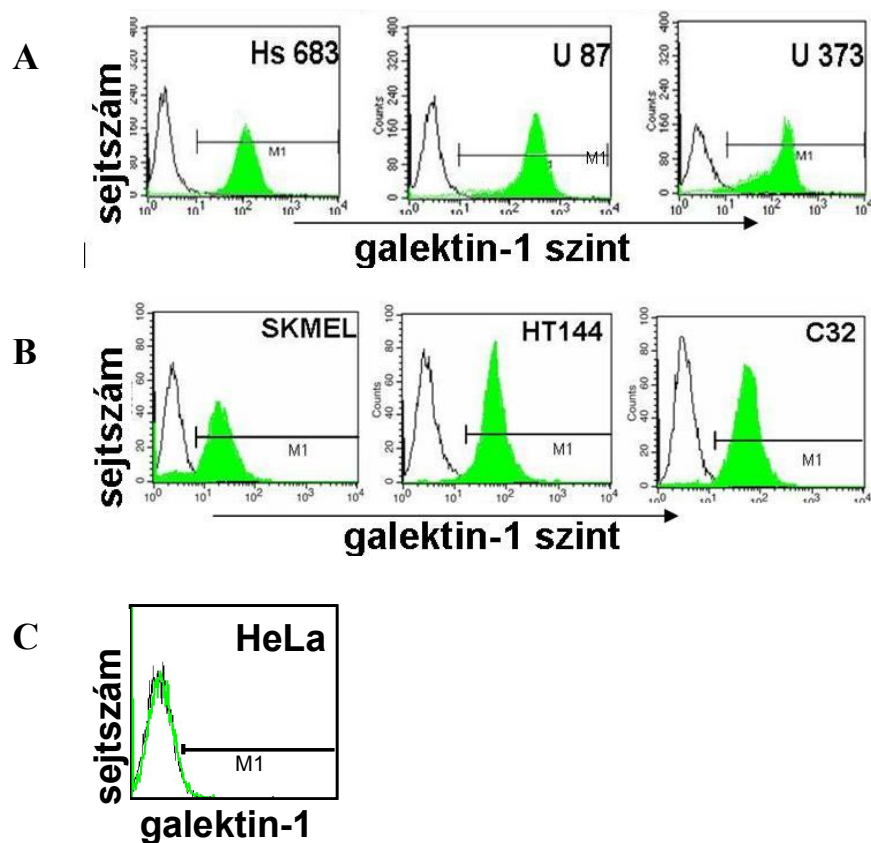
érték el a fedőlemezen. A T sejtek morfológiai alapon is megkülönböztethetők (kisebb, kerek sejtek) az adherens tumorsejtektől, azonban a tumorsejtek osztódáskor elvesztik adherenciájukat, lekerekednek, és méretük hasonlóvá válik a T sejtekéhez. Ez teszi szükségessé a T sejtek Hoechst33342 festékkel történő jelölését.

Ellenőriztük, hogy a festés nem befolyásolja-e a T sejtek életképességét. A T sejteket a korábban megállapított, a életképesség és növekedés szempontjából legideálisabb koncentrációban (5×10^5 sejt/ml) adtuk a tumorsejtekhez. Az apoptózist fluorokrómmal konjugált AnnexinV molekula használatával kimutattuk, ami általánosan, széles körben alkalmazott módszer az apoptózis korai fázisának kimutatására. Az AnnexinV az apoptotikus sejtek membránjának extracelluláris felszínére transzlokálódó foszfatidil-szerinhez kötődik. A foszfatidil-szerin egészséges sejtekben a sejthártya belső oldalán helyezkedik el, majd apoptotikus stimulus hatására a sejtmembrán külső oldalára fordul és a környező sejtek számára fagocitózist indukáló jelként szolgál. A ko-kultúra inkubációs idejének a rekombináns galektin-1 hatásmechanizmusa és előkísérletek alapján a 16 óra bizonyult optimálisnak. A ko-kultúra rendszer előnye, hogy egyszerű fixálási és jelölési eljárás után a két sejttypus közötti kölcsönhatás könnyedén vizsgálható fluoreszcens (4. ábra) és konfokális mikroszkóppal, nagy mintaszám esetén is hatékonyan dokumentálható és kiértékelhető az eredmény.

A dolgozatban használt tumorsejtek jellemzése

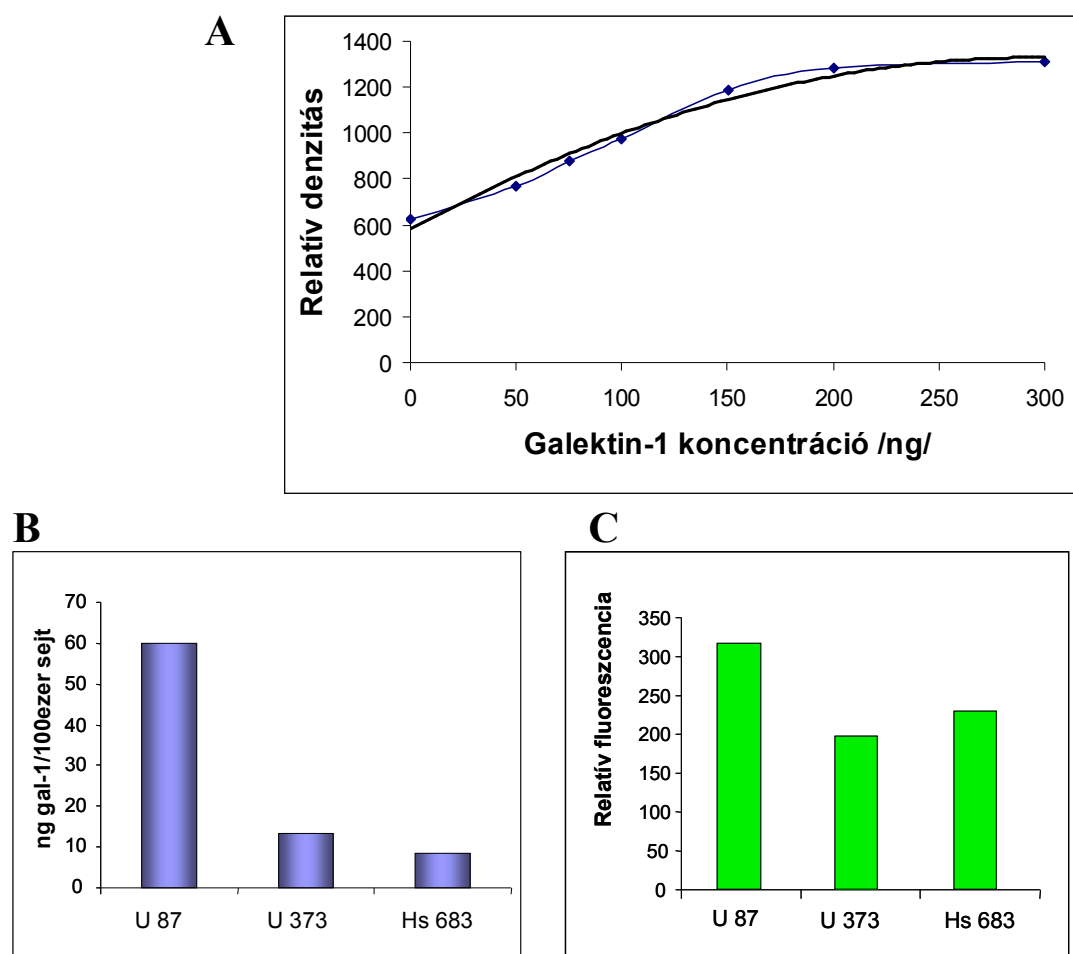
Kísérleteink során galektin-1-et termelő melanóma és glióma sejtekkel dolgoztunk. Negatív kontrollként a HeLa sejtvonalat választottuk, mely nem expresszálja ezt a fehérjét. A galektin-1 sejtfelszíni jelenlétét laboratóriumunkban kifejlesztett monoklonális antitest és fluoreszcens molekulával konjugált másodlagos ellenanyag használatával, áramlási citometriás módszerrel (5. ábra) és fluoreszcens mikroszkóppal (nem bemutatott adat) mutattuk ki.

A 5. ábrán látható, hogy a melanóma és glióma sejtvonalak eltérő mennyiségű galektin-1 proteint expresszálnak, míg a HeLa sejtek felszínén egyáltalán nincs jelen a fehérje. Az összes, tehát intracelluláris és szekretált galektin-1 jelenlétét, illetve hiányát Western blot analízissel igazoltuk.



5. ábra A vizsgált sejtvonalak sejtfelszíni galektin-1 expressziója. A különböző glióma (**A**: Hs683, U87, U373) és melanóma (**B**: SKMEL, HT144, C32), valamint HeLa (**C**) sejteket anti-galektin-1 monoklonális ellenanyaggal, majd Atto488 fluorokrómmal konjugált anti-egér IgG-vel kezeltük, majd a fluoreszcens jelet áramlási citométerrel kimutattuk. A zöld hisztogramok mutatják a galektin-1 jelölésből adódó fluoreszcens jelet, összehasonlítva a fekete, autofluoreszcenciát jelző görbével.

Az egyes tumoros sejtvonalak galektin-1 termelésének összehasonlításához szemi-kvantitatív Western blotting kísérletet végeztünk. Ismert mennyiségű galektin-1-et (0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 ng) adtunk az e fehérjét nem expresszáló Jurkat sejtek lizátumhoz, ehhez hasonlítottuk a vizsgálandó sejtvonalak gal-1 tartalmát. A kapott jelet denzitometráltuk és a gal-1 standard sor adataira görbét illesztettünk (6. ábra). A grafikonra illesztett görbe egyenletébe behelyettesítve a tumorsejt lizátumok által adott értékeket, kiszámolhatjuk, hogy a gélre felvitt sejtmennyiség mennyi galektin-1-et tartalmaz. Százezer sejtre kiszámolva azt az eredményt kaptuk, hogy az U87 glioblasztóma sejtvonal háromszor annyi ($60 \text{ ng}/10^5 \text{ sejt}$) galektin-1-et termel, mint a másik két glióma (6.B ábra).

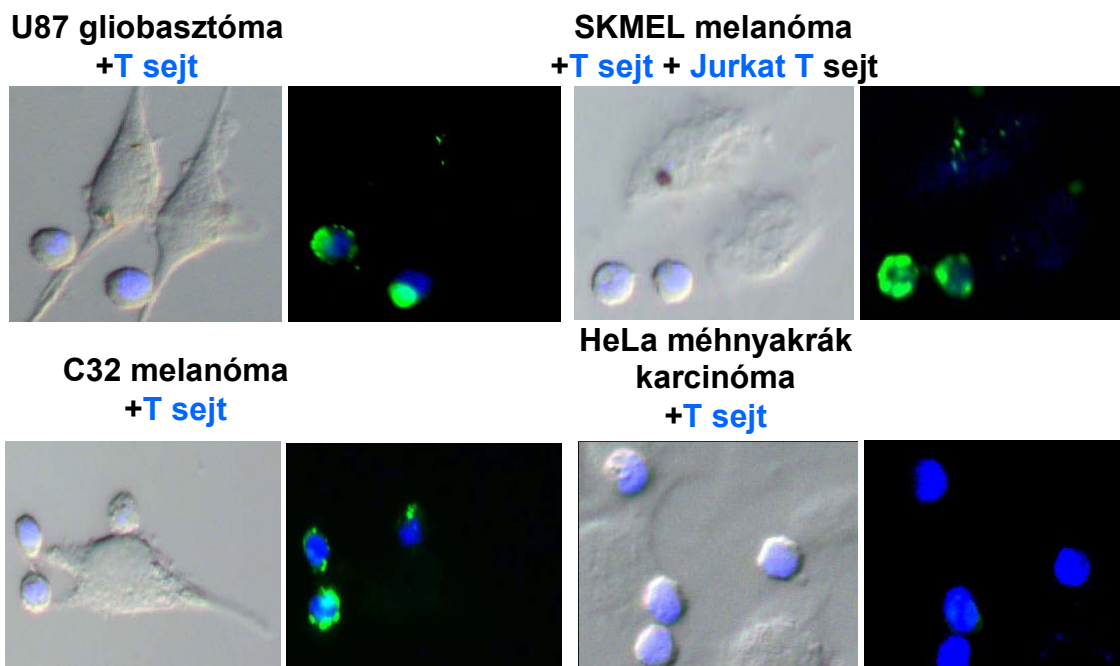


6. ábra A glióma sejtvonalak galektin-1 tartalmának meghatározása Western blottal és áramlási citometriával. **A:** A galektin-1 standard sor Western blot kísérlet denzitometrlásából származó értékeinek grafikonos ábrázolása, az illesztett exponenciális görbével. **B:** Az illesztett görbe egyenletéből számolt galektin-1 mennyiség a különböző glióma sejtvonalakban, 100 000 sejtre számolva. **C:** A különböző glióma sejtvonalak sejtfelszíni galektin-1 expressziójának összehasonlítása áramlós citométerrel mért relatív fluoreszcencia intenzitások alapján. A sejtek jelölése az 5. ábra szerint történt.

Az eredmények azt mutatják, hogy az összes expresszált gal-1 nem minden esetben korrelál a szekretált, citofluorimetriával mért sejtfelszíni gal-1 mennyiségével. Ezért a további vizsgálatokhoz az U87 glioblasztóma sejtvonalat választottuk, mely a legtöbb gal-1-et szekretálja. Ennek oka, hogy a gal-1 általunk vizsgált funkciójában az extracelluláris fehérjének van szerepe, mely a sejtmembránon elfoglalt helyzetéből kifolyólag részt vehet a sejt-sejt kommunikációban.

A galektin-1 fehérjét expresszáló tumorsejtek T sejt apoptózist indukálnak

A ko-kultúra kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy a galektin-1-et termelő tumorsejtek a Jurkat T sejtek apoptózisát okozták, szemben a galektin-1 fehérjét nem expresszáló HeLa sejtekkel (7. ábra).

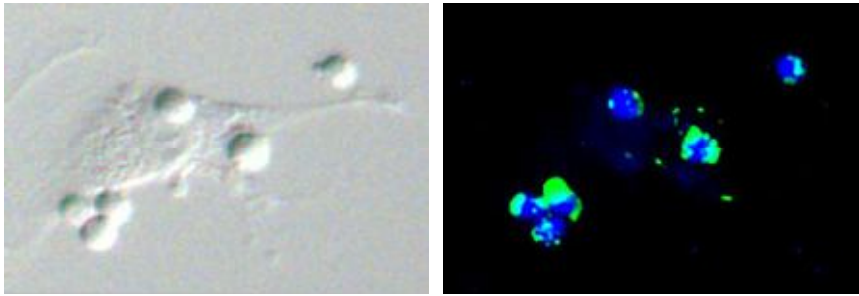


7. ábra A galektin-1-et expresszáló melanóma és glióma sejtek Jurkat T sejtek apoptózisát okozzák a ko-kultúra kísérletek során, szemben a galektin-1 negatív HeLa sejtekkel. A különböző tumoros sejtvonalatokat (U87 glioblasztóma, SKMEL és C32 melanóma és HeLa méhnyakrák karcinóma) Jurkat T sejtekkel tenyésztettünk együtt ko-kultúrák rendszerben 16 órán át. A Jurkat sejtek magját előzetesen Hoechst33342 festékkel megjelöltük (kék). Az inkubációs idő után a sejteket fixáltuk és AlexaFluor488-konjugált Annexin V-tel reagáltattuk. A mintákat fluoreszcens mikroszkóppal analizáltuk. Bal oldali képek: Hoechst33342 (kék, Jurkat) és Nomarsky (szürke) egymásra vetítve. Jobb oldali képek: Hoechst33342 (kék, Jurkat) és Annexin V-AlexaFluor488 (zöld, apoptotikus sejtek) jelek átfedő képe.

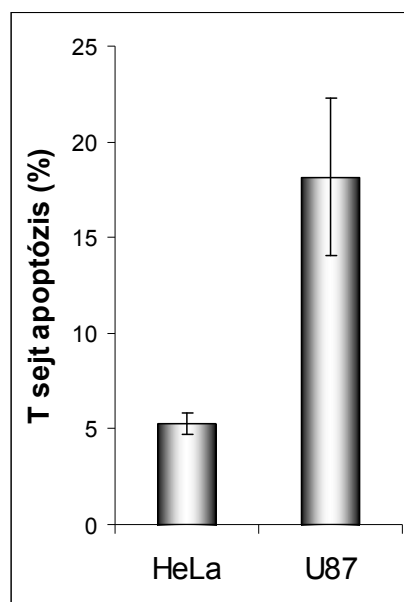
Ebben a rendszerben teszteltünk perifériás vérből izolált, majd aktivált T sejteket is, amelyek a Jurkat sejtekhez hasonlóan apoptózist szenvedtek. Ez egyrészt arra utal, hogy a Jurkat sejtek nem rákos voltak miatt reagálnak az adott módon, másrészt arra, hogy a jelenség *in vivo* is hasonlóképpen lejátszódhat (8. ábra).

A bekövetkezett apoptózis mértékét a következő módon határoztuk meg. Az egyes minták véletlenszerűen kiválasztott területein megszámoltuk az előforduló egészséges

és apoptotikus Jurkat és T sejteket, majd kiszámoltuk az elpusztult sejtek arányát. Megállapítottuk, hogy a HeLa sejtekkel együtt inkubált T sejtek esetében az apoptózis mértéke nem különbözött a fenntartott T sejt kultúrában átlagosan jelen levő elpusztult sejtek arányától, azonban az U87 sejtekkel együtt inkubált T sejtek 20-25%-a apoptózist szenvedett (9. ábra).



8. ábra Az U87 glióma sejtek perifériás vérből származó, aktivált T sejtek apoptózisát okozzák. A kísérlet kivitelezése és ábrázolása a 7. ábra alatt leírtaknak megfelelően történt.

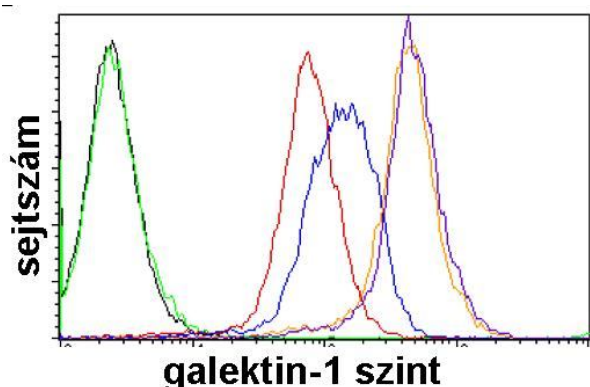


9. ábra A HeLa és U87 sejtek által okozott T sejt apoptózis aránya. A 8. ábrán részletezett ko-kultúra kísérletekben kiszámoltuk az egészséges és apoptotikus sejtek arányát több látómezőben. Egyértelmű, hogy a galektin-1-et expresszáló U87 T sejt apoptózist indukál, míg a HeLa sejteket tartalmazó mintában minimális az elpusztult T sejtek aránya.

A ko-kultúra rendszerben bekövetkező T sejt apoptózist a tumorsejtek által termelt galektin-1 indukálja

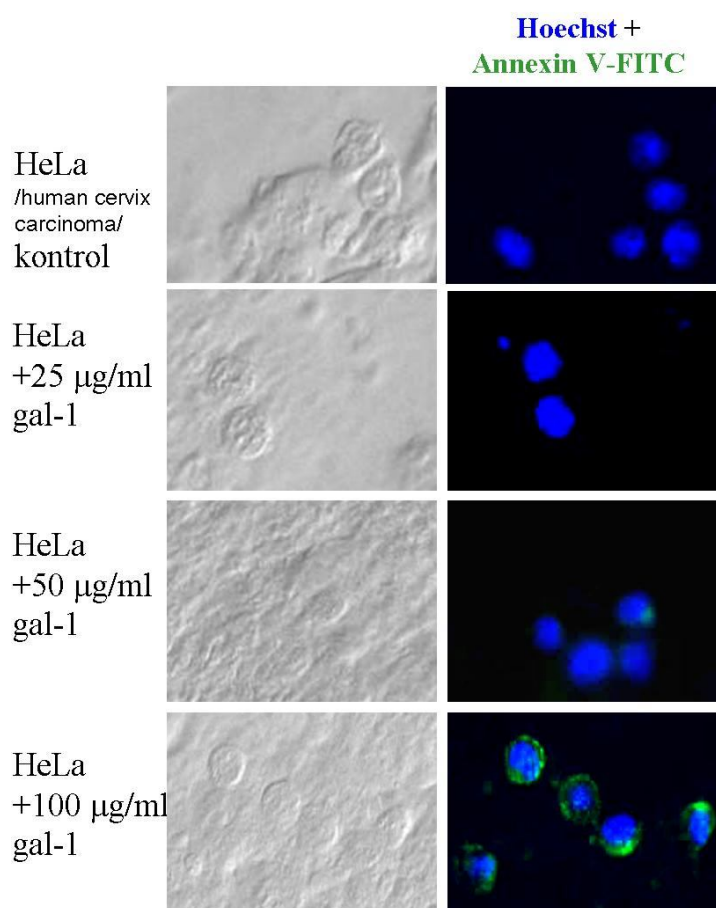
A fenti kísérletek azt mutatják, hogy a galektin-1 fehérjét expresszáló tumorsejtek T sejt apoptózist okoznak, míg a gal-1 negatív tumorsejtek (HeLa) nem váltják ki ezt a T sejt választ. Ezek az eredmények azonban csak jelzik, de nem bizonyítják a gal-1 szerepét a folyamatban. Ezért a következő kísérleteket úgy terveztük, hogy választ adjanak a fenti kérdésre. A részletes vizsgálathoz a fehérjét legnagyobb mennyiségben szekretáló U87 glioblasztóma sejtvonalat választottuk.

Hipotézisünk igazolásához több különböző megközelítést alkalmaztunk. A galektin-1 szerepe igazolható egyrészt úgy, ha a fehérjét nem expresszáló tumorsejt felszínére galektin-1-et „ragasztunk” és megvizsgáljuk az apoptózis indukáló képességet. Ennek érdekében HeLa sejtekhez rekombináns galektin-1-et adtunk (amit laborunkban *E. coli* baktériumban termeltettünk és magunk tisztítottunk (95)) és áramlási citometriával ellenőriztük a sejtekhez kötődött fehérje mennyiségét (10. ábra).



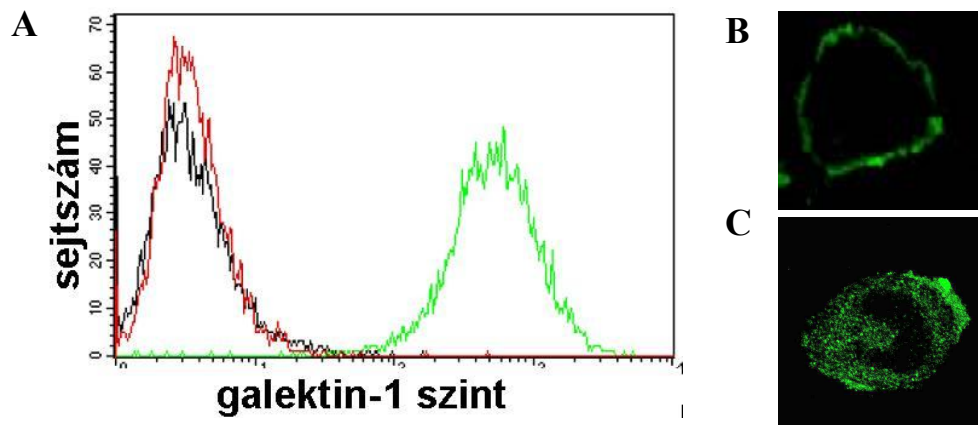
10. ábra A rekombináns galektin-1 koncentráció függő kötődése HeLa sejtekhez. HeLa sejtekhez növekvő koncentrációban adtuk a tisztított galektin-1-et majd a felesleg kimosása után a sejtfelületen maradt galektin-1 mennyiségét anti-galektin-1 monoklonális ellenanyaggal és anti-egér Ig- Atto488 ellenanyaggal jelöltük. Az áramlási citométerrel készített ábrán a fekete hisztogram mutatja az autofluoreszcenciát, a zöld az anti-galektin-1 ellenanyag jele galektin-1 hozzáadása nélkül, a piros 25 µg/ml, a kék 50 µg/ml, az okker 100 µg/ml, lila 150 µg/ml galektin-1 kötődését ábrázolja. Az ábráról leolvasható, hogy a 100 µg/ml galektin-1 már telíti a sejtfelületi kötőhelyeket, hiszen a 150 µg/ml fehérjéből nem kötődik ki nagyobb mennyiség.

Az alkalmazott rekombináns fehérje növekvő mennyiségével arányosan több sejtfelszínre kötődött galektin-1-et tudtunk kimutatni. Ha ilyen, galektin-1-et hordozó HeLa sejtekkel 24 órán keresztül inkubáltunk ko-kultúrában T sejteket, azt tapasztaltuk, hogy a gal-1 nélküli kontrollal ellentétben, a galektin-1-gyel kezelt HeLa sejtek a T sejtek apoptózisát okozták, mégpedig az alkalmazott galektin-1 mennyiségével arányos mértékben (11. ábra).



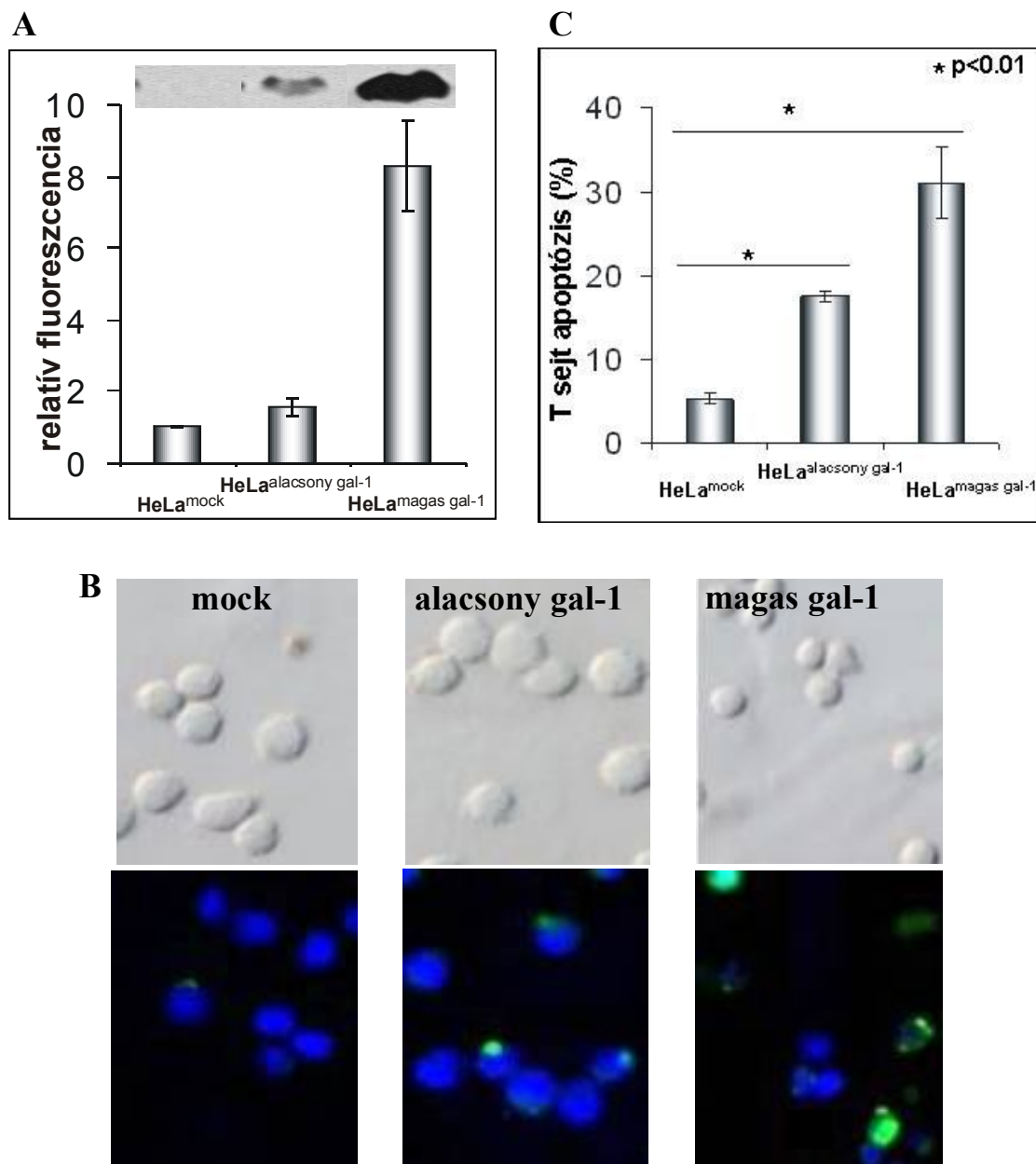
11. ábra A sejtfelszínén rekombináns galektin-1-et kötő HeLa sejtek T sejt apoptózist indukálnak. A HeLa sejtekhez különböző koncentrációban (0, 25, 50, 100 µg/ml) rekombináns galektin-1-et adtunk, majd a nem kötődő felesleg fehérjét kimosva, a tumorsejteket Jurkat sejtekkel tartottuk ko-kultúrában és vizsgáltuk a 7. ábránál részletezett módon. A T sejthalál mértéke az alkalmazott galektin-1 koncentrációjával arányosan nő.

Az apoptotikus hatás eléréséhez a gal-1 kezelt HeLa sejtekhez jelölés után azonnal hozzá kellett adni a T sejteket. Ennek oka az, hogy - amint azt laboratóriumunkban korábban kimutattuk (96)- a gal-1 gyorsan internalizálódik a kezelt sejtekbe. A 12. ábra is mutatja, hogy T sejtek távollétében a HeLa sejtek is aktívan internalizálják a fehérjét.



12. ábra A hozzáadott rekombináns galektin-1 internalizálódik a HeLa sejtekben. **A:** Áramlási citometriával követtük, hogy a HeLa sejtekhez adott rekombináns galektin-1 (zöld grafikon) 3 óra múlva eltűnik a sejtfelszínről (piros hisztogram). A fekete görbe az autofluoreszcencia szintje. A sejtfelszíni galektin-1-et a 10. ábránál részletezett módon mutattuk ki. **B:** a FITC-jelzett galektin-1 a HeLa sejtekhez történő adás után a sejtmembránhoz kötődik. **C:** Három óra elteltével a fehérje már a citoplazmában található. A FITC-konjugált galektin-1 lokalizációját konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

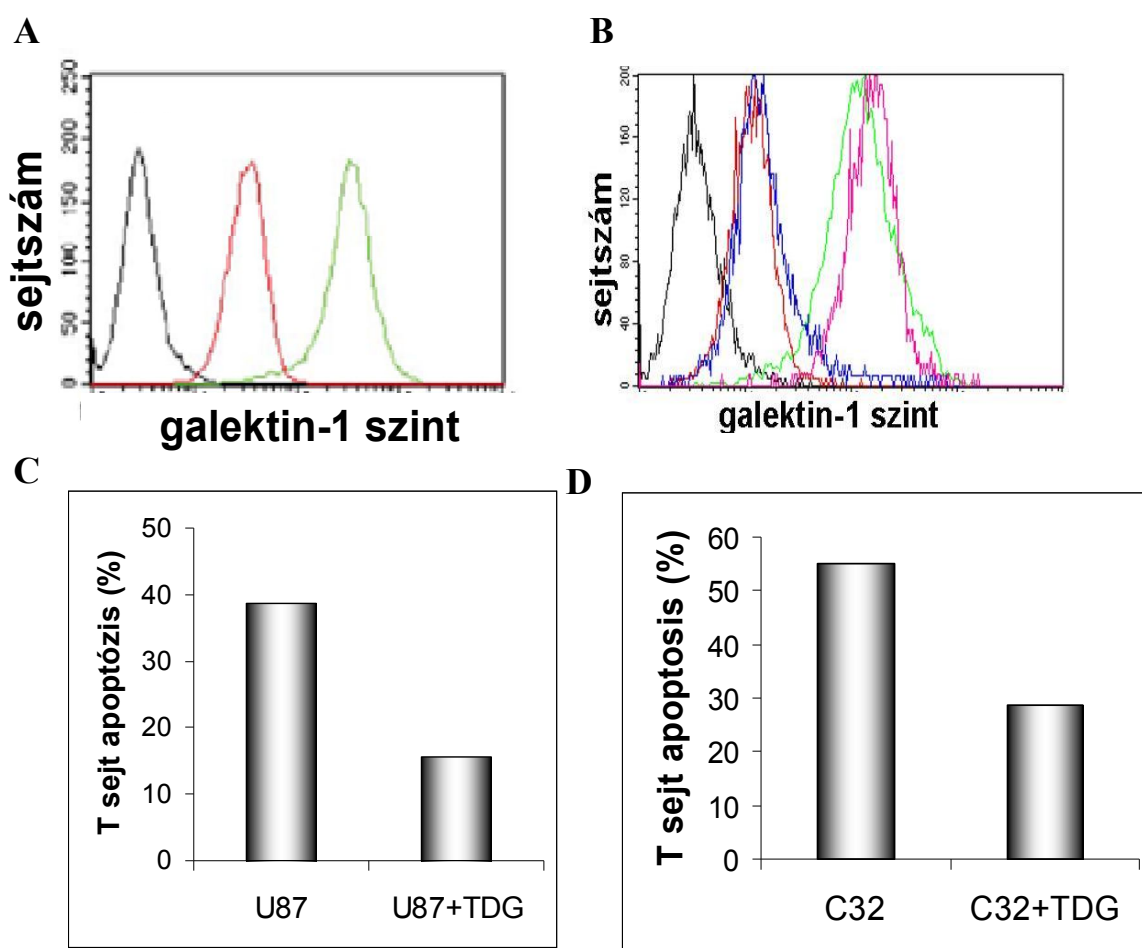
Nem csak a HeLa sejtekhez adott rekombináns gal-1 tette a tumor sejteket citotoxikussá. Gal-1-et különböző mértékben expresszáló stabil gal-1 transzgenikus HeLa sejtvonalakat állítottunk elő, kontrollként üres plazmiddal transzfektáltunk sejteket. A létrehozott sejtvonalak gal-1 termelését Western blot analízissel és áramlási citometriával ellenőriztük (13.A ábra). A klónok közül egy alacsony ($\text{HeLa}^{\text{alacsony gal-1}}$), valamint egy magas ($\text{HeLa}^{\text{magas gal-1}}$) szinten gal-1-et expresszáló (13.A ábra inszert) és szekretáló (13.A. ábra) sejtvonalat választottunk ki. A ko-kultúrák során megállapítottuk, hogy a transzgenikus galektin-1-et termelő HeLa sejtek közül azok, amelyek kevesebb galektin-1 fehérjét prezentálnak felszínükön, a T sejtek kisebb mértékű apoptózisát okozták, mint a nagyobb mennyiségű galektin-1-et expresszálók (13.B és C ábra). Az indukált T sejt apoptózis mértéke tehát függ a sejtfelszíni galektin-1 mennyiségétől, ami alátámasztja, hogy a sejthalál fő effektor molekulája a galektin-1.



13. ábra A transzgénikus galektin-1-et expresszáló HeLa sejtek jellemzése és apoptózis indukáló képessége. **A:** A stabilan transzfektált HeLa sejtek által termelt össz galektin-1-et Western blot technikával, illetve a sejtfelszínen megjelenítő mennyiséget áramlási citofluorimetriával vizsgáltuk, az 5. és 6. ábránál leírt módon. **B:** A transzgénikus HeLa sejtvonalak és Jurkat T sejtek ko-kultúrák vizsgálata, a 7. ábránál részletezett kísérleti rendszerben. **C:** Az apoptotikus sejtek arányát kvantitáltuk és több kísérlet eredményét diagrammban foglaltuk össze. Az okozott T sejt apoptózis mértéke arányosan nő a sejtfelszínen prezentált galektin-1 mennyiségének növekedésével.

A HeLa sejtekkel ellentétben számos tumorsejt nagy mennyiségű gal-1-et termel. A galektin-1 T sejt apoptózis kiváltásában betöltött szerepe vizsgálható úgy is, ha egy galektin-1-et expresszáló tumorsejt felszínéről eltávolítjuk a fehérjét. A galektin-1

minimál ligandjával, a laktózzal lemosható a sejtfelszíni gal-1. A laktóz a galektin-1 szénhidrátkötő motívumához kapcsolódik, így nagy feleslegben alkalmazva leszorítja a fehérjét a sejtfelszínről, ahol az a glikozilált oldalláncokhoz kötődött. Kísérleteinkben egy laktóz analógot, a thiodigalaktozidot (TDG) használtuk, ami hatékonyan csökkentette a sejtfelszíni galektin-1 mennyiségét (14.A ábra). A sejtek továbbtenyésztése laktóz távollétében a gal-1 időfüggő sejtfelszíni visszatérését eredményezi (14.B ábra), a galektin-1 mennyisége a TDG-s kezeléssel lecsökkentett szintről 12-14 óra elteltével visszaáll az eredeti szintre.

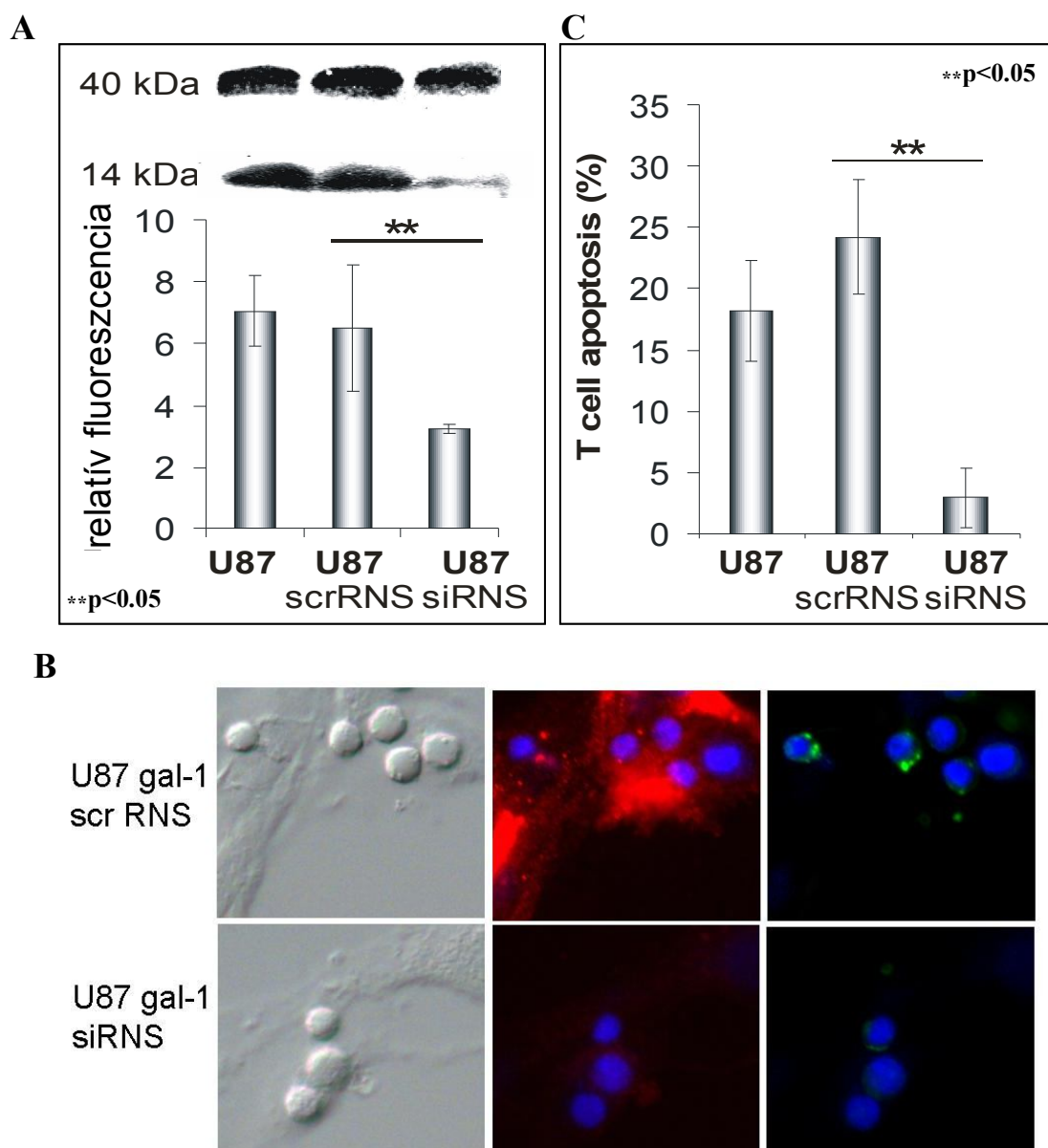


14. ábra A tumorsejtek membránjáról a galektin-1 nagy része TDG kezeléssel eltávolítható, ezzel csökken az apoptózis-indukáló képessége is. **A és B:** Az U87 sejtfelszíni galektin-1 mennyiségét 30 mM TDG-vel való kezelés nélkül (zöld hisztogram) és után (piros hisztogram) áramlási citometriával ellenőriztük, a galektin-1-et az 5. ábra alatt részletezett módon detektáltuk. **B:** A TDG kezelést követő öt órában még nem indul meg a galektin-1 szint helyreállítása, amint a kék görbe jelzi. A rózsaszín hisztogram pedig bizonyítja, hogy 12 óra elteltével visszaáll az eredeti galektin-1 szint. A fekete görbe az autofluoreszcenciát mutatja. **C és D:** U87 és C32 indukálta T sejt apoptózist TDG mosás nélkül és után ko-kultúrában ellenőriztük a 7. ábránál leírt rendszerben.

A sejtfelszíni gal-1 eltávolítása az U87 sejtek T sejt apoptózist indukáló hatásának csökkenésével járt (14.C ábra). Hasonló eredményeket kaptunk emberi (14.D. ábra) és egér melanoma (nem bemutatott adat) sejtekkel, igazolva, hogy a gal-1 termelő tumorok általánosan a gal-1 fehérje aktivitásával idézik elő a T sejt halált. A TDG által lecsökkentett sejtfelszíni galektin-1 mennyiség a ko-kultúra 16 órás inkubációs ideje alatt fokozatosan állt vissza az eredeti szintre (14.B ábra), azonban a rendelkezésre álló idő nem volt elegendő az apoptózis elindításához.

Az U87 glioblasztóma sejtek gal-1 termelésének stabil csökkenését a galektin-1 expresszió siRNS-sel történő csendesítésével is elvégeztük. A gal-1 siRNS-t, illetve a kontroll scrRNS-t (scrambled RNS) kifejező sejteket a szelekciót és klónozást követően Western blottinggal (teljes gal-1 tartalom), illetve áramlási citometriával (sejtfelszíni galektin-1 szint) jellemeztük. A scrRNS-t expresszáló sejteken a teljes (intra- és extracelluláris együtt) és a sejtfelszíni galektin-1 mennyisége sem változott a nem transzfektált, vad típusú U87 sejtekkel összehasonlítva, míg az siRNS-sel transzfektált sejtek expressziója és szekréciója jelentősen csökkent (15.A. ábra). Összehasonlítva ezen sejtek által ko-kultúrában indukált T sejt apoptózis mértékét azt kaptuk, hogy az siRNS-t kifejező (csökkentett sejtfelszíni galektin-1-gyel rendelkező) U87 sejtek kisebb mértékű T sejt apoptózist okoztak, mint a kezeletlen vagy scrRNS-t expresszáló sejtek (15.B és C ábra).

Ezek az eredmények egyértelműen megmutatták, hogy a galektin-1 központi szerepet játszik az U87 sejtek által ko-kultúra rendszerben okozott T sejt apoptózis indukációjában. Az okozott T sejthalál mértéke összefügg a tumorsejt által expresszált és különösen a szekretált galektin-1 mennyiségével.

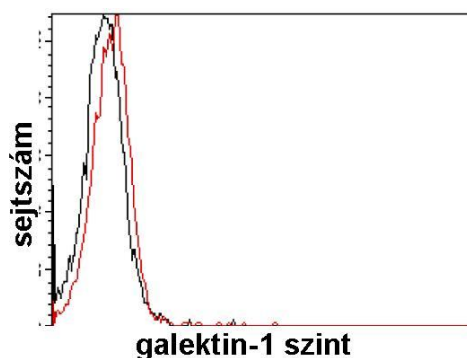


15. ábra Az U87 glióma galektin-1 scrRNS-sel és siRNS-sel transzfektált, stabil sejtvonainak jellemzése. **A:** Áramlási citometriás és Western blot kísérletek is bizonyítják, hogy a galektin-1 génjének csendesítés sikeres volt az adott U87 klónban, valamint hogy a scrRNS-t kifejező sejtek galektin-1 termelése a vad típushoz hasonlít. A kísérleteket az 5. és 6. ábránál leírt módon végeztük. **B:** az U87 sejtvonalakot a 7. ábra alatt leírt módon tenyésztettük együtt Jurkat sejtekkel és jelöltük a mikroszkópos analízisre. A sejtfelszíni galektin-1-et itt anti-galektin-1 monoklonális ellenanyaggal és Northern Lights 557- konjugált anti-egér Ig szekunder ellenanyaggal mutattuk ki (piros). A mikroszkópos analízis során is megfigyelhetők a gyengébb galektin-1 jelet mutató géncsökkentett sejtek. **C:** az oszlopdiagram a ko-kultúras rendszerben elpusztult T sejtek arányát ábrázolva egyértelművé teszi, hogy rendszerünkben a galektin-1 a T sejtekre citotoxikus faktor, hiszen a géncsökkentett U87 sejtek szignifikánsan kisebb mértékű Tsejt apoptózist indukálnak, mint a vad típusú, vagy scrRNS-t kifejező glioblasztóma sejtek.

A tumorsejt eredetű galektin-1 indukálta T sejt apoptózis mechanizmusa hasonló a rekombináns fehérje által elindított sejthaláléhoz

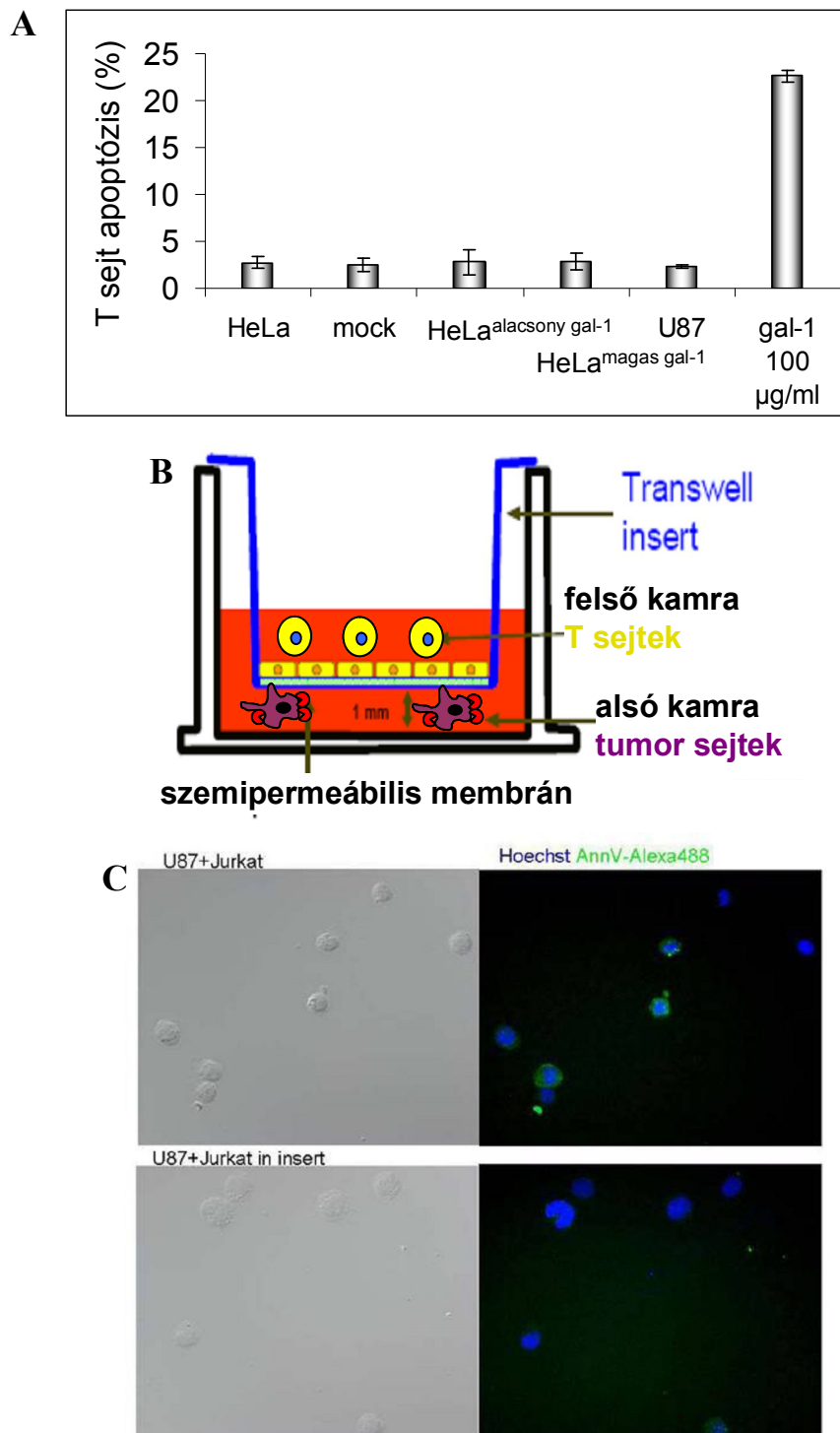
A ko-kultúra kísérletek során megfigyeltük, hogy a tumorsejtek és a T sejtek fizikai kölcsönhatásba kerülnek egymással. A sejt-sejt kapcsolatban számos molekula részt vehet, többek közt a sejtfelszíni galektin-1 is. Az előző kísérletekkel bebizonyítottuk, hogy a galektin-1 a legfőbb effektor molekula a T sejt apoptózis indukciójában. Kérdésünk az volt, hogy a vizsgált biológiai hatáshoz szükség van-e a kialakuló sejt-sejt kölcsönhatásra.

Ennek érdekében először megvizsgáltuk, hogy a galektin-1-et expresszáló tumorsejtek koncentrált felülúszója tartalmaz-e gal-1-et és toxikus-e a T sejtekre. A T sejtekhez adott U87 kondicionált médiumából nem kötődött galektin-1 a T sejtek felszínére, ahogy azt az áramlási citometriás analízis mutatta (16. ábra).



16. ábra Az U87 sejtenyésző médiumából nem kötődik ki galektin-1 a T sejtek felszínére. Jurkat T sejteket felvettünk az U87 sejtekről származó felülúszóban, majd a kötődési inkubációs idő (1 óra) után a sejtfelszíni galektin-1-et az általánosan használt protokoll alapján jelöltük (5. ábra), áramlási citometriával detektáltuk.

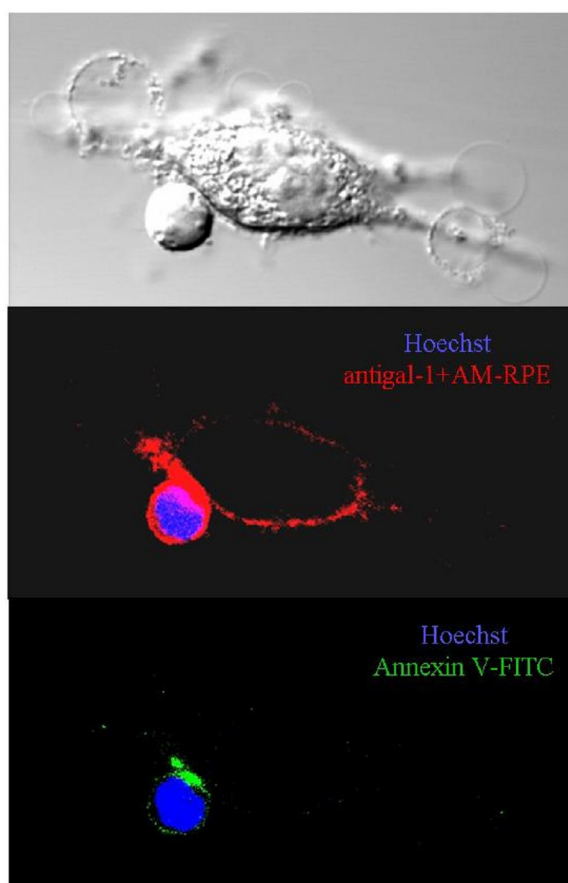
Amikor a T sejteket az U87 illetve a transzgénikus galektin-1-et kifejező HeLa sejtek kondicionált médiumában tartottuk, nem tapasztaltunk apoptózist, hasonlóan a vad típusú, vagy kontroll, üres plazmiddal transzfektált HeLa sejtekről nyert médiumhoz. A pozitív kontrollként használt rekombináns gal-1 a várt T-sejt apoptózist váltotta ki (17.A ábra). Ez a kísérlet alátámasztotta, hogy galektin-1 nem szolúbilis faktorként hat, valamint azt is jelezte, hogy a tumorsejtek nem termelnek más, a gal-1-től eltérő citotoxikus szolúbilis faktort, erősítve a gal-1 meghatározó szerepét ebben a folyamatban.



17. ábra A tumorsejtek által termelt galektin-1 nem szolubilis formában, hanem sej-sejt kapcsolat révén fejti ki apoptotikus hatását a T sejtekre. **A:** A galektin-1-et expresszáló (low, high) és a kontrol HeLa (HeLa, mock) és U87 sejtek felülúszóját hozzáadtuk Jurkat T sejtekhez, majd 24 óra elteltével szub-G1 analízissel vizsgáltuk a kiváltott apoptózist. Pozitív kontrollként rekombináns galektin-1-et alkalmaztunk 100 µg/ml koncentrációban. **B:** A transwell rendszer kísérleti elrendezése lehetővé teszi a két sejt fizikai elválasztását, míg a felülúszó a szemipermeabilis membránon át szabadon közlekedhet. **C:** Transwell inszertben (alsó ábra) vagy inszert nélküli (felső ábra) ko-kultúrában vizsgáltuk a kiváltott apoptózist Jurkat sejteken, a jelölés a 7. ábra alatt leírtak szerint történt. Apoptózist csak abban az esetben találtunk, amikor a két sejt típus közötti direkt kölcsönhatás létrejöhetett.

Ezt az eredményt erősítette a transwell kísérlet is. Ebben a rendszerben a 24 lyukú sejtenyészítő lemezhez egy inszert tartozik, amelynek alját egy félig áteresztő hártya képezi. Az U87 illetve HeLa sejteket a szövettenyészítő lemez aljára növesztettük. Az inszertbe helyeztük a T sejteket, amelyek így fizikailag el voltak választva az adherens tumorsejtektől, de az inszert membránja a szolúbilis faktorok áramlását nem gátolta (17.B ábra). Ilyen elrendezésben a T sejtek nem szenvedtek apoptózist, szemben a fizikai kölcsönhatást megengedő ko-kultúrák rendszerrel (17.C. ábra). Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a tumorsejtek által termelt galektin-1 direkt sejt-sejt kölcsönhatás során indukálja a T sejtek apoptózist.

A ko-kultúra kísérletek során lehetőségünk volt a mintákon a galektin-1 megjelölésére is. Az ilyen módon elkészített mintákat analizálva konfokális mikroszkóppal megfigyeltük, hogy azon T sejtek felszínén, amelyek apoptózist szenvedtek, a galektin-1 jelenléte kimutatható (18. ábra).

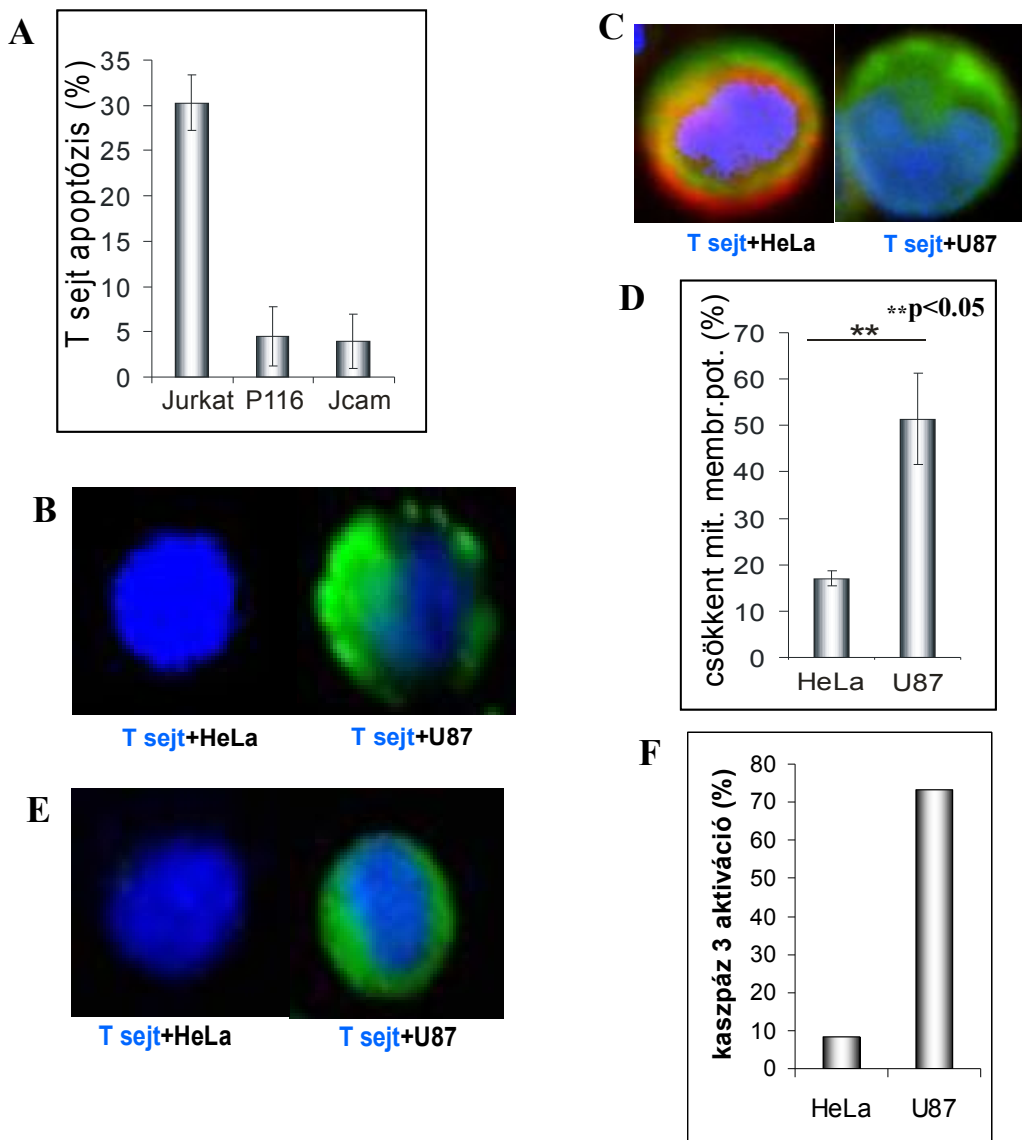


18. ábra A tumorsejt eredetű galektin-1 transzlokációja a T sejtre. Az U87 tumorsejtek és Jurkat T sejtek ko-kultúrák rendszerben való tenyésztése után a mintákat a 7. ábra szerint készítettük el, majd konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A Jurkat T sejtek magját a Hoechst33342 festék kékkel jelöli, az apoptotikus sejteken az AnnexinV-AlexaFluor488 zöld színt ad, az NL577 festékkel konjugált anti-egér IgG pedig piros színnel jeleníti meg az egér monoklonális ellenanyaggal jelölt galektin-1-et.

Eredményeink arra utalnak, hogy a fehérje a tumorsejtről közvetlen sejt-sejt kölcsönhatás során átkerül a T sejtre és annak apoptózist indukálja. A fehérje ugyanis nem fejeződik ki ezekben a T sejtekben, továbbá a T sejtek felszínén csak akkor jelenik meg, ha azok galektin-1-et expresszáló tumorsejtekkel vannak ko-kultúrában, melyben a szoros sejt-sejt kontaktus létrejöhet a tumorsejt és a T-sejt között.

A rekombináns galektin-1 által indukált T sejt apoptózis részletes molekuláris mechanizmusát csoportunk korábbi munkáiban leírta (97;98), és megállapította, hogy a gal-1 a sejthalál mitokondriális, kaszpáz 3 függő útját okozza. Jelen tanulmányban megvizsgáltuk, hogy a tumorsejt eredetű galektin-1 okozta T sejt halál szignál transzdukciós útvonala mennyire összevethető a tisztított fehérje által kiváltott folyamat lépéseivel.

Az apoptózis kiváltásának első lépése a tumorsejt eredetű galektin-1 transzlokációja a T sejtre. Ennek mechanizmusa illetve a sejthalál közvetítő receptor ez idáig ismeretlen. Feltételezzük, hogy a galektin-1-nek a tumorsejtről a T sejtre való áthelyeződésének hátterében az állhat, hogy a T sejten levő specifikus receptornak nagyobb az affinitása a galektin-1-hez, mint a tumorsejten levő glikozilált oldalláncoknak. Korábbi, rekombináns galektin-1 fehérjével végzett kísérleteink szerint az apoptózisban szerepet játszik a T sejtekre jellemző két kináz, a p56^{lck} és a ZAP70. Ezen enzimek részvételét az enzimen hiányos Jurkat T sejtek alkalmazásával vizsgáltuk. A p116 nevű T sejtvonalban a ZAP70 enzim génjében mutációt generáltak (99), minek következtében nem történt génátírás, azaz a géntermék sem RNS, sem fehérje szinten nem volt jelen a p116 sejtvonalban. A JCam1.6 T sejtvonal a p56^{lck} enzim deficienciáját hordozza (100). A kináz hiányos sejteket vizsgálva ko-kultúra rendszerben azt tapasztaltuk, hogy ezek a T sejtek nem szenvedtek apoptózist az U87 sejtekkel való együtt inkubálás során, míg a vad típusú T sejtek igen (19.A. ábra). A kísérlet azt igazolta, hogy az említett enzimek szerepet játszanak a tumorsejt eredetű galektin-1 indukálta T sejt apoptózisban, hasonlóan a rekombináns gal-1-gyel indukált sejthalálhoz. A sejthalál mértékét fluoreszcens festékekkel kapcsolt AnnexinV jelöléssel követtük (19.A és B ábra), ami a foszfátidil-szerinnek a sejtmembrán külső lipidrétegébe való átfordulását jelzi. Ez a lépés bekövetkezik mind a rekombináns, mind a tumorsejtek által termelt galektin-1 okozta T sejt apoptózis folyamán.



19. ábra A tumorsejt termelte galektin-1 által kiváltott T sejt apoptózis mechanizmusa hasonló a rekombináns galektin-1 által kiváltottéhoz. **A:** A Jurkat, p56^{lck} (JCam) vagy ZAP70 (p116) deficiens T sejtekkel és U87 glioblasztóma sejtekkel végzett ko-kultúra kísérletek kvantitálása, az Annexin V – kötő apoptotikus sejtek arányának feltüntetésével. **B:** A foszfatidil-szerin molekula transzlokációja a Jurkat sejtmembrán extracelluláris felületére a ko-kultúrák (jobb oldal:U87, bal oldal: HeLa) tenyésztés után Annexin V- AlexaFluor488 kötődésével (zöld), konfokális mikroszkóppal követve. **C és D:** A ko-kultúrában tartott sejtek JC-1 festékkel való feltöltés utáni konfokális mikroszkópos vizsgálata. A képen piros szín jelzi az egészséges mitokondriumokat (bal panel, HeLa és Jurkat), a jobb panelen az U87-tel együtt tartott Jurkat sejtben a piros szín hiánya a mitokondriumok membránpotenciál csökkenését jelzi. Az oszlopdiagram a csökkent mitokondriális membránpotenciálú T sejtek arányát mutatja HeLa illetve U87 sejtekkel történt együtt inkubáció után ($p < 0.05$). **E és F:** A ko-kultúrák rendszerben a sejteket fixálás és permeabilizálás után az aktív kaspáz 3-at felismerő ellenanyaggal és FITC-jelzett anti-nyúl IgG ellenanyaggal jelöltük, a jelet fluoreszcens mikroszkóppal detektáltuk, majd a pozitív sejtek arányát oszlopdiagramban ábrázoltuk.

A következő lépésben megvizsgáltuk a ko-kultúra kísérletek során a mitokondriális membrán potenciál változását. Erre alkalmas a JC-1 membrán permeábilis fluoreszcens festék, ami monomer formában a sejtek citoplazmájába kerülve zöld színnel jelenik meg, az egészséges mitokondriumba bejutva azonban feldúsul és piros színt ad. Az apoptotikus sejtekben a mitokondriális membrán potenciál csökkenése miatt a festék nem képes a mitokondriumban feldúsulni, így ezekben a sejtekben csak zöld festődést tapasztalunk. Az egészséges sejtekben jelen van a zöld és a piros szín is (19C. ábra). A mikroszkópos analízis alatt a csökkent mitokondriális membránpotenciált mutató, valamint az egészséges sejteket megszámoltuk, és arányukat meghatároztuk (19.D ábra), amelyből kiderül, hogy a galektin-1-et nem termelő HeLa-val szemben a gal-1 pozitív U87 glióma a T sejtekben közel 50%-ban mitokondriális membránpotenciál csökkenést váltott ki. A kaszpázok szerepét az aktív kaszpáz 3-ra specifikus ellenanyaggal bizonyítottuk. A 19.E ábrán látható, hogy az U87, a HeLa sejtekkel ellentétben, a kaszpáz kaszkád aktiválódásával kísért apoptózist indított el a T sejtekben. Ezt igazolja a kísérlet kvantitálásával kapott grafikon is (19.F. ábra).

A tumorsejt eredetű galektin-1 tehát hasonló molekuláris útvonalon indukál T sejt apoptózist, mint a rekombináns fehérje. A ko-kultúra rendszer az *in vivo* állapotokat jól reprezentálja, így joggal feltételezzük, hogy a folyamat *in vivo* körülmények között is hasonlóképpen játszódik le. A tumor sejtek által termelt galektin-1 tehát részt vesz a tumor specifikus immunválasz gátlásában az aktivált T sejtek apoptózisának indukciója révén.

DISZKUSSZIÓ

A dolgozat három éves munka eredményeit öleli fel. Ez idő alatt összehasonlítottuk különböző tumorsejtek galektin-1 expresszióját, vizsgáltuk a tumorsejt eredetű galektin-1 tumorspecifikus immunválasz kivédésében betöltött szerepét, különös tekintettel a tumorsejtek T sejtekre kifejtett apoptotikus hatására és az apoptózis mechanizmusára. Az általunk leírt folyamat, melynek során a galektin-1 közvetlen sejt-sejt kölcsönhatást követően átkerül a T sejtre és annak apoptózist okozva, hozzájárul a tumorspecifikus immunválasz kivédéséhez, új eredmény, melyet a szakirodalomban eddig nem közöltek. Jelentős annak felismerése is, hogy a tumorsejtek által termelt számos immunmoduláló citokin közül a gal-1 a fő T sejtekre ható citotoxikus faktor.

A galektin-1 transzlokáció mechanizmusa ez idáig ismeretlen. Korábbi eredmények egy specifikus receptor meglétét feltételezik, mivel a galektin-1 csak a T sejteken okoz apoptózist, viszont számos egyéb sejt típus halálát annak ellenére sem váltja ki, hogy ezen sejtek (hivatkozások) sejt felszíni molekuláinak glikozilált oldalláncaihoz is kötődik. Számos közlemény jelent meg a galektin-1 receptorát kutató munkákból, de egy molekuláról sem sikerült egyértelműen bizonyítani, hogy a galektin-1 által indított szignál transzdukcióért lenne felelős (101-103). Pace és munkatársai által publikált eredmények szerint a CD7 sejt felszíni molekula szükséges a galektin-1 által okozott apoptózis beindításához (104), valamint Fajka-Boja és munkatársai kimutatták a galektin-1 és a CD7 sejt felszíni és intracelluláris kollokizációját (105). Csoportunk tervei között szerepel az apoptotikus szignál közvetítő receptor azonosítása. A galektin-1-nek a tumorsejtről a T sejtre történő „átugrására” magyarázat lehet, hogy a fehérje a receptorához nagyobb affinitással kötődik, mint egyéb sejt felszíni glikokonjugátumokhoz.

Ebben a munkában bemutattuk, hogy a galektin-1 transzlokációja a tumorsejtről a T sejtre, szükséges a T sejt apoptózis indukcióhoz. A ko-kultúra rendszerben tehát a fehérje nem szolúbilis állapotban hat. A legtöbb, galektin-1-gyel foglalkozó közleményben szolúbilis, rekombináns fehérjével végzett kísérletekről olvashatunk (106). Ezen eredmények *in vivo* rendszerbe történő adaptálhatósága kérdéses, hiszen a fehérje a szénhidrátkötő képessége révén azonnal visszakötődik a sejt típustól

függetlenül nagy mennyiségben jelen levő sejtfelszíni glikozilált oldalláncokhoz, vagy az extracelluláris mátrix (ECM) fehérjéihez. Tehát *in vivo* a galektin-1 nincs jelen szolúbilis formában. Jiale He és Linda G. Baum 2003-ban megjelent közleményében (107) viszont leírja, hogy a szilárd fázishoz (az ECM-ot modellező fehérjekeverékhez) kötött galektin-1 is T sejt apoptózist indukál. Ez a rendszer jobban közelít az *in vivo* állapothoz. Az általunk kidolgozott ko-kultúra rendszerben a tumorsejtek által termelt galektin-1 hatását vizsgáltuk. Kiküszöböltük a rekombináns fehérje használatát, ami legtöbbször számos kérdést vet fel a baktériumban termeltetett majd tisztított molekulával kapcsolatban. Kísérleteinkben a tumorsejt eredetű galektin-1 a sejtmembrán fehérjéinek glikozilált oldalláncjaihoz kötötten hat, így jól modellezi az *in vivo* állapotokat.

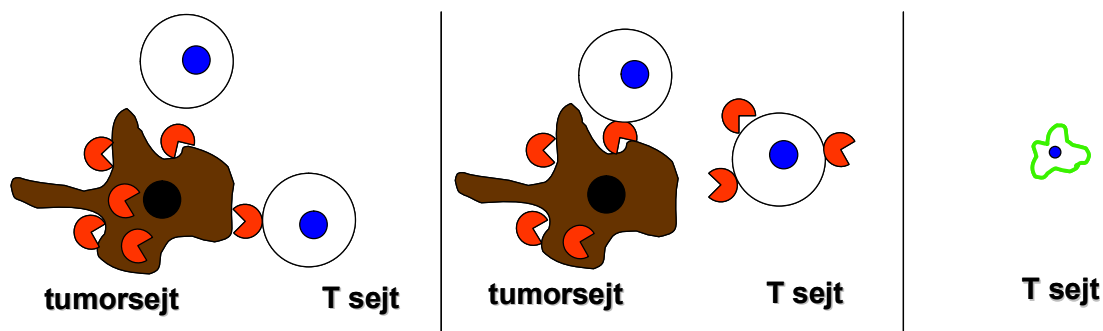
Megállapítottuk, hogy a ko-kultúra rendszerben tapasztalt T sejt apoptózis molekuláris mechanizmusának fő lépései megegyeznek a korábban rekombináns galektin-1 használatával felállított útvonallal. Ez a tény azt sugallja, hogy az abban a munkában használt 1,8 μ M fehérje koncentráció közel állhat az *in vivo* körülmények között előforduló galektin-1 mennyiségéhez. Találkozhatunk az irodalomban ettől eltérő adatokkal is, például HP Hahn és munkatársai által 2004-ben közölt cikk galektin-1 indukálta kaszpáz és citokróm c független T sejt apoptózisról ír (108). Az ebben az esetben tapasztalt mechanizmus lényege az endonukleáz G enzim transzlokációja a mitokondriumból a sejtmagba, ahol DNS degradáció történik. A T sejt apoptózist 20 μ M galektin-1 adásával indukálták, ami több mint tízszerese az általunk használt mennyiségnek és valószínűleg messze áll a fiziológiás koncentrációtól.

Számos közlemény hangsúlyozza a galektin-1 kulcsfontosságú szerepét a tumor progresszióban. Végrehajtották a galektin-1 génjének csendesítését B16 egér melanóma sejtvonalon siRNS technikával. Két érdekes munkát közöltek ilyen sejtekkel végzett kísérleti eredményekből. Rubinstein és munkatársai leírták, hogy a galektin-1 géncsendesített B16 melanóma sejtek progressziója egérbe oltva lassabb, mint a vad típusú B16-é (109). Mathieu és munkatársai által közölt cikkben bemutatják, hogy azok a B16 sejtek, amelyekben a galektin-1 génjét csendesítették, érzékenyebben reagáltak a temozolomid nevű kemoterapeutikumra, így a B16 sejtekkel oltott, majd galektin-1 siRNS-sel és temozolomiddal együtt kezelt egerek túlélése megnőtt a többi csoporthoz képest. Erre alapozva felvetnek egy olyan terápiás

lehetőséget, amelyben a galektin-1 siRNS-t valamilyen kemoterapeutikummal együtt alkalmaznák lokálisan (110).

A gal-1 szerepét a tumorprogresszióban az a közlemény igazolja legjobban, melyben gal-1 knock out egérben vizsgálták a tumorfejlődést. F₉ teratokarcinóma sejteket oltottak normál és galektin-1 knock out egerekbe. Három nappal az oltást követően nem találtak eltérést a két típusú egér tumor mérete között. Tizenöt nap elteltével viszont a normál egerekben négyszer akkora tumor fejlődött, mint a galektin-1 knock out egerekben. Ez azt jelenti, hogy a galektin-1 a tumor iniciációban nem, a további fejlődésben azonban fontos szerepet játszik. Megvizsgálva a tumorok erezettségét, azt tapasztalták, hogy a normál egerekben kifejlődött tumor dúsabb erezettséggel rendelkezik, mint a galektin-1 knock out egerek tumorja. Az eredmények azt bizonyítják, hogy a galektin-1 a hajszálérképződéshez (angiogenezis) nélkülözhetetlen faktor. Brian R. Gastman és munkatársai az általunk alkalmazott ko-kultúra rendszerhez hasonló módszerrel kimutatták, hogy fej-nyak rák sejtek a velük együtt inkubált T sejtek apoptózisát okozták (111). Az eredmények szerint a sejthalál részben Fas mediált útvonalon zajlik, részben a másik fő, mitokondriális membrán depolarizációjával járó útvonalon. Korábban leírták, hogy a fej nyak rák sejtvonalak legtöbbje galektin-1-et expresszál (112), így valószínűleg szerepet játszik a T sejt apoptózis indukcióban. Ezt ebben a munkában nem vizsgálták, a mi adataink azonban ezt sugallják.

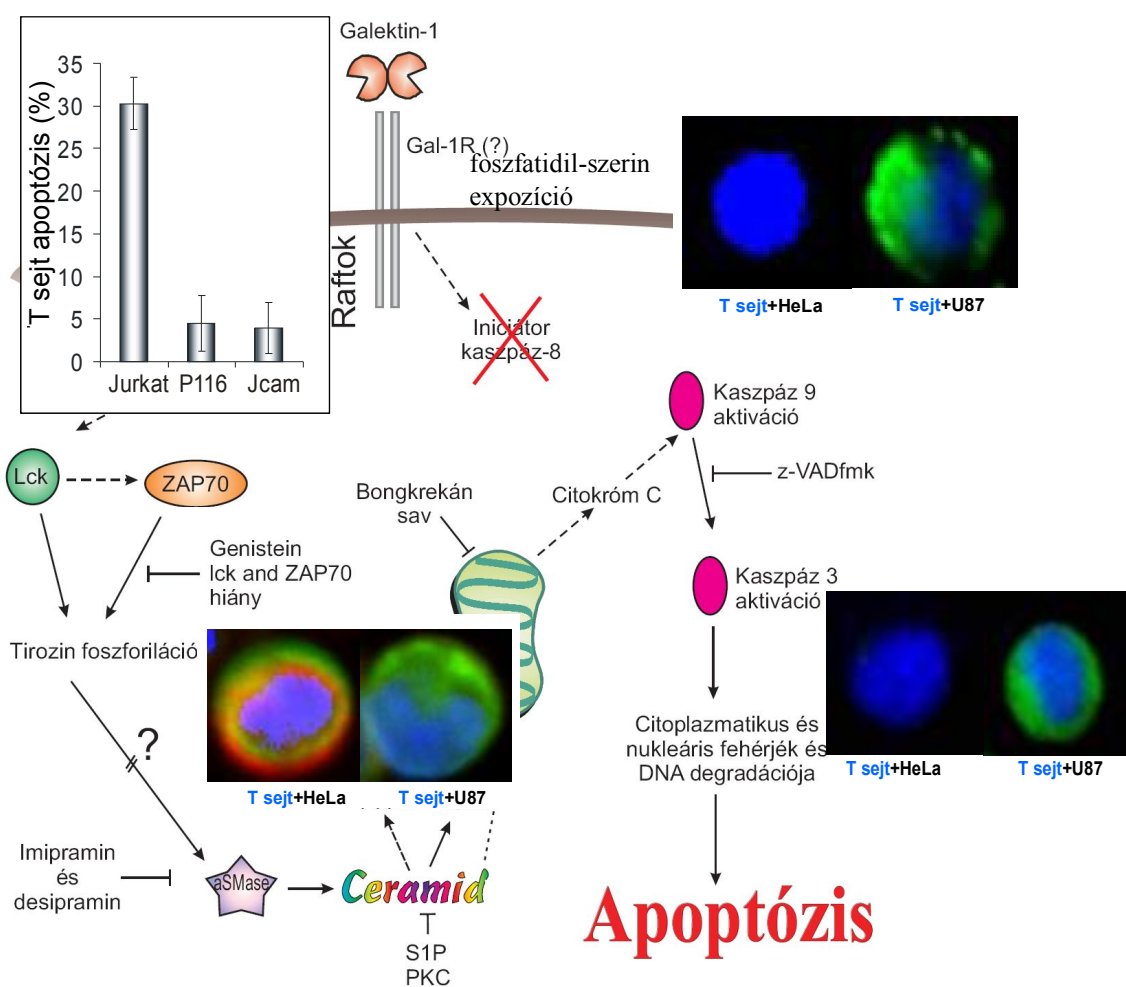
Eredményeink birtokában felépítettünk egy modellt, amely a tumor fejlődése során a T limfocitákkal in vivo lezajló kölcsönhatás lehetséges körülményeit reprezentálja. A 20. ábra a tumorsejt és az effektor T sejt közötti kölcsönhatást mutatja, melynek eredménye a T sejt apoptózissal történő elpusztulása.



20. ábra A galektin-1 (piros alakzat) termelő tumorsejt (barnával jelölve) felszínéről a fehérje átkerül a vele fizikai kölcsönhatásba kerülő T sejtre (kék magvú, fehér sejt) és annak apoptózist (zölddel) okozza.

Modellünk szerint a tumor sejtek gal-1-et expresszálnak és szekretálnak. A szekretált gal-1 azonnal visszakötődik a tumor sejtek felszínéhez. A tumor sejtekkel sejt-sejt kapcsolatba kerülő T-sejtek mintegy „átveszik” a gal-1-et a tumor sejtről, és megindul az apoptózis.

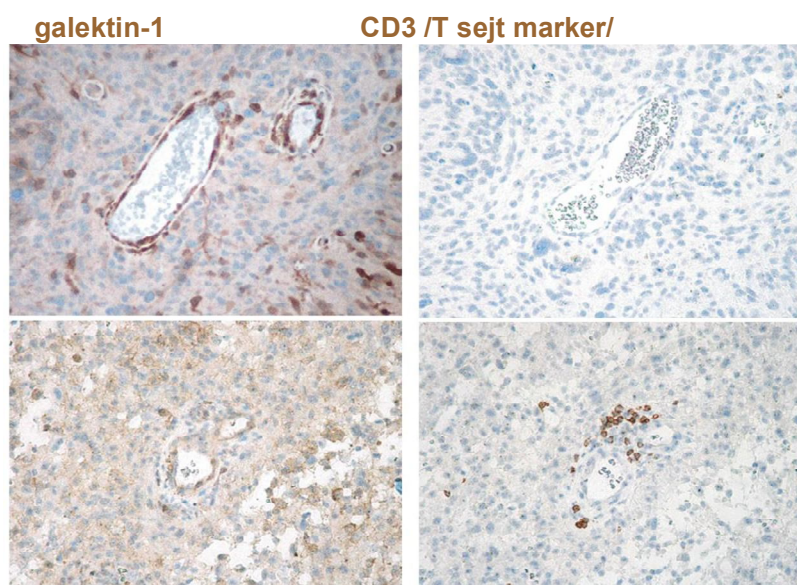
A 21. ábrán összefoglaltuk azt a sematikus modellt, melyet a rekombináns galektin-1 által indukált T sejt apoptózis molekuláris mechanizmusához állítottunk fel (113;114).



21. ábra A két apoptotikus útvonal összehasonlítása során megfigyelhetjük, hogy a tumorsejt eredetű galektin-1 indukálta T sejt apoptózis lépései ($p56^{lck}$ és a ZAP70 részvétele, mitokondriális membrán potenciál csökkenése, foszfatidil-szerin expozíció) megegyeznek a rekombináns galektin-1 által mediált T sejt halál lépéseivel.

Ebbe a sémába illesztettük a tumorsejt eredetű galektin-1 okozta T sejt halál általunk vizsgált lépéseit. A ko-kultúra kísérletek jól alátámasztották korábbi eredményeinket a szolubilis gal-1 által indukált apoptózis mechanizmusát illetően. Az általunk alkalmazott ko-kultúrák rendszerben vizsgálható fő események, az I κ B és ZAP70 kinázok részvétele, a membrán aszimmetria felbomlása, a mitokondriális membrán potenciál csökkenése és a kaszpáz kaszkád aktiválódása, megegyeznek a rekombináns gal-1-gyel indukált T-sejt apoptózis lépéseivel.

Glioblasztóma metszetek immunhisztokémiai vizsgálata rámutatott, hogy a galektin-1 nem csak ilyen módon vehet részt az immunválasz gátlásában. A tumorszövetben újonnan képződött kapillárisok falában lévő endothel sejtréteg ugyanis erős galektin-1 pozitivitást mutat. Ezeken a területeken nem találtunk a tumorszövetbe infiltrálódó T sejteket, szemben a szomszédos, alacsonyabb szintű galektin-1 expressziót mutató régióval, ahol találtunk T limfocitákat a szövetben.



23. ábra A paraffinba ágyazott szöveti metszeteket galektin-1, illetve CD3 ellenanyaggal és peroxidáz enzimmal konjugált második ellenanyaggal festettük. A két különböző jelölést szomszédos metszeteken végeztük. A nagy mennyiségű galektin-1-et expresszáló ereken nem jutnak át a T sejtek, mivel a szövetben nem találunk CD3 festődést. Ahol a fehérje kisebb mennyiségben van jelen, ott megtörténik a T sejtek érből való kilépése.

Az eredmény arra utal, hogy a galektin-1 akadályozza a T sejtek endothel rétegen való átjutását, érből való kilépését, így gátolva az immunválasz kialakulását. Ezek az

eredményeink összhangban vannak a saját (115) és az irodalmi adatokkal (116), melyek kimutatták, hogy a gal-1 gátolja az érett és progenitor hematopoietikus sejtek migrációját, érfalon keresztül történő átjutását, ezáltal is kifejtve gyulladáscsökkentő hatását.

Az esetek többségében elmondható, hogy az *in vitro* tesztrendszerek csak korlátozottan alkalmasak az *in vivo* folyamatok modellezésére. A tumorsejtek által szekretált galektin-1 immunszuppresszív szerepének vizsgálatára nem alkalmas a tisztított, rekombináns fehérje használata, ugyanis jelenleg nem áll rendelkezésre adat a galektin-1 tumoros környezetben előforduló lokális koncentrációjáról. Ennek hiányában nem tudhatjuk, hogy a rekombináns fehérjét milyen koncentrációban használjuk. A terápiás stratégiák meghatározása érdekében is hasznos lenne megtudni, hogy a galektin-1 mekkora mennyiségben van jelen a tumorban vagy a tumor asszociált sztrómában. A probléma áthidalására kifejlesztettük a ko-kultúra módszert, amely modell talán az *in vivo* állapothoz legközelebb álló rendszer. A teszt alkalmas lehet terápiás alkalmazások hatásának korai fázisban történő ellenőrzésére, különböző, a galektin-1 hatását gátolni hivatott vegyületek kipróbálására is.

ELÉRT ÚJ EREDMÉNYEK

A témában közölt publikációk által leírtakba jól illeszkednek a kísérleteink során kapott adatok. A ko-kultúra rendszer alkalmazása, ahol közvetlenül a tumorsejt eredetű galektin-1 vizsgálható, feloldja az irodalomban fellelhető ellentmondásokat a rekombináns galektin-1 alkalmazásával kapcsolatban. Validálja korábbi, rekombináns fehérjével végzett kísérleteink eredményeit, az okozott T sejt apoptózis mechanizmusának hasonlósága arra enged következtetni, hogy az általunk használt 1,8 μ M galektin-1 koncentráció az adekvát, az *in vivo* körülmények között előforduló mennyiséghez legközelebb álló érték. A dolgozatban elsőként írtuk le az alábbi eredményeket:

- a tumorsejtek által expresszált galektin-1 T sejt apoptózist okoz ko-kultúra rendszerben
- a tumorsejt eredetű galektin-1 által indukált T sejt apoptózis molekuláris mechanizmusa hasonló a rekombináns fehérje okozta T sejt haláléhoz
- kísérleti rendszerünkben (valószínűleg *in vivo* is) az apoptózis indukcióban a membrán kötött galektin-1 vesz részt, nem szolúbilis formában hat
- a galektin-1 termelő tumorsejtek sejtfelületén prezentált galektin-1 mennyiségét egy részletesen nem vizsgált mechanizmus tartja állandó szinten.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani elsősorban Monostori Évának, a Limfocita Szigénál Transzdukciós Laboratórium vezetőjének és Raskó István igazgatónak, hogy lehetővé tették az MTA SZBK Genetikai Intézetében a doktori munkám elvégzését.

Monostori Évát külön hálás köszönet illeti a gondos témavezetésért és a sok segítségért, amit a felmerülő problémák megoldása kapcsán nyújtott.

Köszönöm a Limfocita Szigénál Transzdukciós Laboratórium lelkes munkatársainak együttműködését az itt végzett munkám során: Fajka-Boja Robertának a szakmai segítségét és a dolgozatom gondos átolvasását, Blaskó Andreának azért, hogy rendelkezésemre bocsátotta melanóma sejtekkel kapott eredményeit, Szebeni Gábor Jánosnak, hogy elkészítette a HeLa sejtek transzfektálásához felhasznált plazmidokat, Gercsó Andrásnének a kiváló technikai segítségéért, Végh Leának a transzfektált HeLa sejtekkel végzett Western blotting kísérletért.

Köszönöm Katona Róbertnek és Blaszó Péternek a galektin-1 géncsendesítéshez készített konstrukciókat, Tubak Vilmosnak az ko-kultúra rendszer értékes ötletét és Krenács Lászlónak az immunhisztokémiás vizsgálatok elvégzését.

Köszönettel tartozom Kotogány Editnek az áramlási citofluoriméter használatában, Ferhan Ayaydinnak a konfokális mikroszkópiában és Tóth Sándornének az ábrák elkészítésében nyújtott segítséget.

Köszönöm Robert Kissnek (Free University of Brussels) a glioblasztóma sejtvonalakat és szöveti metszeteket, valamint Robert T. Abraham (Mayo Clinic, Rochester) és Arthur Weiss (Howard Hughes Medical Institute, San Francisco, USA) professzornak a rendelkezésünkre bocsátott sejtvonalakat.

A munkához az OTKA 69047 pályázat nyújtott kutatási támogatást.

BIBLIOGRÁFIA

1. Barondes, S. H., Castronovo, V., Cooper, D. N., Cummings, R. D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M. A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K., and . (1994) *Cell* **76**, 597-598
2. Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y., and Poirier, F. (2004) *Glycoconj.J.* **19**, 433-440
3. Cooper, D. N. and Barondes, S. H. (1990) *J.Cell Biol.* **110**, 1681-1691
4. Hughes, R. C. (1999) *Biochim.Biophys.Acta* **1473**, 172-185
5. Seelenmeyer, C., Wegehangel, S., Tews, I., Kunzler, M., Aebi, M., and Nickel, W. (2005) *J.Cell Biol.* **171**, 373-381
6. Perillo, N. L., Marcus, M. E., and Baum, L. G. (1998) *J.Mol.Med.* **76**, 402-412
7. Cooper, D. N., Massa, S. M., and Barondes, S. H. (1991) *J.Cell Biol.* **115**, 1437-1448
8. Zhou, Q. and Cummings, R. D. (1993) *Arch.Biochem.Biophys.* **300**, 6-17
9. Ozeki, Y., Matsui, T., Yamamoto, Y., Funahashi, M., Hamako, J., and Titani, K. (1995) *Glycobiology* **5**, 255-261
10. Cooper, D. N. and Barondes, S. H. (1990) *J.Cell Biol.* **110**, 1681-1691
11. Horie, H., Inagaki, Y., Sohma, Y., Nozawa, R., Okawa, K., Hasegawa, M., Muramatsu, N., Kawano, H., Horie, M., Koyama, H., Sakai, I., Takeshita, K., Kowada, Y., Takano, M., and Kadoya, T. (1999) *J.Neurosci.* **19**, 9964-9974
12. Toscano, M. A., Commodaro, A. G., Ilarregui, J. M., Bianco, G. A., Liberman, A., Serra, H. M., Hirabayashi, J., Rizzo, L. V., and Rabinovich, G. A. (2006) *J.Immunol.* **176**, 6323-6332
13. van den, B. F., Califice, S., Garnier, F., Fernandez, P. L., Berchuck, A., and Castronovo, V. (2003) *Lab Invest* **83**, 377-386
14. van den, B. F., Califice, S., Garnier, F., Fernandez, P. L., Berchuck, A., and Castronovo, V. (2003) *Lab Invest* **83**, 377-386
15. Kuwabara, I., Sano, H., and Liu, F. T. (2003) *Methods Enzymol.* **363**, 532-552
16. Zhou, Q. and Cummings, R. D. (1993) *Arch.Biochem.Biophys.* **300**, 6-17
17. van den, B. F., Califice, S., Garnier, F., Fernandez, P. L., Berchuck, A., and Castronovo, V. (2003) *Lab Invest* **83**, 377-386

18. Cooper, D. N. and Barondes, S. H. (1990) *J.Cell Biol.* **110**, 1681-1691
19. Cooper, D. N., Massa, S. M., and Barondes, S. H. (1991) *J.Cell Biol.* **115**, 1437-1448
20. Gu, M., Wang, W., Song, W. K., Cooper, D. N., and Kaufman, S. J. (1994) *J.Cell Sci.* **107 (Pt 1)**, 175-181
21. Watt, D. J., Jones, G. E., and Goldring, K. (2004) *Glycoconj.J.* **19**, 615-619
22. Gu, M., Wang, W., Song, W. K., Cooper, D. N., and Kaufman, S. J. (1994) *J.Cell Sci.* **107 (Pt 1)**, 175-181
23. Moiseeva, E. P., Williams, B., Goodall, A. H., and Samani, N. J. (2003) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **310**, 1010-1016
24. McGraw, J., Gaudet, A. D., Oschipok, L. W., Kadoya, T., Horie, H., Steeves, J. D., Tetzlaff, W., and Ramer, M. S. (2005) *Exp.Neurol.* **195**, 103-114
25. Puche, A. C. and Key, B. (1995) *J.Comp Neurol.* **357**, 513-523
26. Raabe, E. H., Yoshida, K., and Schwarting, G. A. (1997) *Brain Res.Dev.Brain Res.* **101**, 187-196
27. Ion, G., Fajka-Boja, R., Toth, G. K., Caron, M., and Monostori, E. (2005) *Cell Death.Differ.* **12**, 1145-1147
28. Ion, G., Fajka-Boja, R., Kovacs, F., Szebeni, G., Gombos, I., Czibula, A., Matko, J., and Monostori, E. (2006) *Cell Signal.*
29. Garin, M. I., Chu, C. C., Golshayan, D., Cernuda-Morollon, E., Wait, R., and Lechler, R. I. (2007) *Blood* **109**, 2058-2065
30. La, M., Cao, T. V., Cerchiaro, G., Chilton, K., Hirabayashi, J., Kasai, K., Oliani, S. M., Chernajovsky, Y., and Perretti, M. (2003) *Am.J.Pathol.* **163**, 1505-1515
31. Delbrouck, C., Doyen, I., Belot, N., Decaestecker, C., Ghanooni, R., de Lavareille, A., Kaltner, H., Choufani, G., Danguy, A., Vandenhoven, G., Gabius, H. J., Hassid, S., and Kiss, R. (2002) *Lab Invest* **82**, 147-158
32. Rabinovich, G. A., Sotomayor, C. E., Riera, C. M., Bianco, I., and Correa, S. G. (2000) *Eur.J.Immunol.* **30**, 1331-1339
33. Rabinovich, G. A., Sotomayor, C. E., Riera, C. M., Bianco, I., and Correa, S. G. (2000) *Eur.J.Immunol.* **30**, 1331-1339
34. Rabinovich, G. A., Sotomayor, C. E., Riera, C. M., Bianco, I., and Correa, S. G. (2000) *Eur.J.Immunol.* **30**, 1331-1339
35. Correa, S. G., Sotomayor, C. E., Aoki, M. P., Maldonado, C. A., and Rabinovich, G. A. (2003) *Glycobiology* **13**, 119-128

36. Correa, S. G., Sotomayor, C. E., Aoki, M. P., Maldonado, C. A., and Rabinovich, G. A. (2003) *Glycobiology* **13**, 119-128
37. Zuniga, E., Gruppi, A., Hirabayashi, J., Kasai, K. I., and Rabinovich, G. A. (2001) *Infect.Immun.* **69**, 6804-6812
38. Levrony, E. L., Aguilar, H. C., Fulcher, J. A., Kohatsu, L., Pace, K. E., Pang, M., Gurney, K. B., Baum, L. G., and Lee, B. (2005) *J.Immunol.* **175**, 413-420
39. Rabinovich, G. A., Ariel, A., Hershkovich, R., Hirabayashi, J., Kasai, K. I., and Lider, O. (1999) *Immunology* **97**, 100-106
40. Santucci, L., Fiorucci, S., Cammilleri, F., Servillo, G., Federici, B., and Morelli, A. (2000) *Hepatology* **31**, 399-406
41. Baum, L. G., Blackall, D. P., Arias-Magallano, S., Nanigian, D., Uh, S. Y., Browne, J. M., Hoffmann, D., Emmanouilides, C. E., Territo, M. C., and Baldwin, G. C. (2003) *Clin.Immunol.* **109**, 295-307
42. Rabinovich, G. A., Ariel, A., Hershkovich, R., Hirabayashi, J., Kasai, K. I., and Lider, O. (1999) *Immunology* **97**, 100-106
43. Santucci, L., Fiorucci, S., Cammilleri, F., Servillo, G., Federici, B., and Morelli, A. (2000) *Hepatology* **31**, 399-406
44. van der, L. J., van den, B. A., Blokzijl, T., Harms, G., van Goor, H., Zwiers, P., van Weeghel, R., Poppema, S., and Visser, L. (2004) *J.Pathol.* **204**, 511-518
45. Baum, L. G., Blackall, D. P., Arias-Magallano, S., Nanigian, D., Uh, S. Y., Browne, J. M., Hoffmann, D., Emmanouilides, C. E., Territo, M. C., and Baldwin, G. C. (2003) *Clin.Immunol.* **109**, 295-307
46. Chung, C. D., Patel, V. P., Moran, M., Lewis, L. A., and Miceli, M. C. (2000) *J.Immunol.* **165**, 3722-3729
47. Vespa, G. N., Lewis, L. A., Kozak, K. R., Moran, M., Nguyen, J. T., Baum, L. G., and Miceli, M. C. (1999) *J.Immunol.* **162**, 799-806
48. Rabinovich, G. A., Ariel, A., Hershkovich, R., Hirabayashi, J., Kasai, K. I., and Lider, O. (1999) *Immunology* **97**, 100-106
49. van der, L. J., van den, B. A., Blokzijl, T., Harms, G., van Goor, H., Zwiers, P., van Weeghel, R., Poppema, S., and Visser, L. (2004) *J.Pathol.* **204**, 511-518
50. Saussez, S., Lorfevre, F., Lequeux, T., Laurent, G., Chantrain, G., Vertongen, F., Toubau, G., Decaestecker, C., and Kiss, R. (2008) *Oral Oncol.* **44**, 86-93
51. Ouellet, M., Mercier, S., Pelletier, I., Bounou, S., Roy, J., Hirabayashi, J., Sato, S., and Tremblay, M. J. (2005) *J.Immunol.* **174**, 4120-4126

52. He, J. and Baum, L. G. (2004) *J.Biol.Chem.* **279**, 4705-4712
53. Phillips, B., Knisley, K., Weitlauf, K. D., Dorsett, J., Lee, V., and Weitlauf, H. (1996) *Biol.Reprod.* **55**, 548-558
54. Wollina, U., Schreiber, G., Gornig, M., Feldrappe, S., Burchert, M., and Gabius, H. J. (1999) *Histol.Histopathol.* **14**, 779-784
55. Hirabayashi, J., Ayaki, H., Soma, G., and Kasai, K. (1989) *Biochim.Biophys.Acta* **1008**, 85-91
56. Blois, S. M., Ilarregui, J. M., Tometten, M., Garcia, M., Orsal, A. S., Cordero-Russo, R., Toscano, M. A., Bianco, G. A., Kobelt, P., Handjiski, B., Tirado, I., Markert, U. R., Klapp, B. F., Poirier, F., Szekeres-Bartho, J., Rabinovich, G. A., and Arck, P. C. (2007) *Nat.Med.* **13**, 1450-1457
57. Berberat, P. O., Friess, H., Wang, L., Zhu, Z., Bley, T., Frigeri, L., Zimmermann, A., and Buchler, M. W. (2001) *J.Histochem.Cytochem.* **49**, 539-549
58. Gillenwater, A., Xu, X. C., el Naggar, A. K., Clayman, G. L., and Lotan, R. (1996) *Head Neck* **18**, 422-432
59. Sanjuan, X., Fernandez, P. L., Castells, A., Castronovo, V., van den, B. F., Liu, F. T., Cardesa, A., and Campo, E. (1997) *Gastroenterology* **113**, 1906-1915
60. Shimonishi, T., Miyazaki, K., Kono, N., Sabit, H., Tuneyama, K., Harada, K., Hirabayashi, J., Kasai, K., and Nakanuma, Y. (2001) *Hum.Pathol.* **32**, 302-310
61. van den, B. F., Califice, S., Garnier, F., Fernandez, P. L., Berchuck, A., and Castronovo, V. (2003) *Lab Invest* **83**, 377-386
62. Yuan, J. and Yankner, B. A. (2000) *Nature* **407**, 802-809
63. Riedl, S. J. and Shi, Y. (2004) *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **5**, 897-907
64. Ion, G., Fajka-Boja, R., Toth, G. K., Caron, M., and Monostori, E. (2005) *Cell Death.Differ.* **12**, 1145-1147
65. Ion, G., Fajka-Boja, R., Kovacs, F., Szebeni, G., Gombos, I., Czibula, A., Matko, J., and Monostori, E. (2006) *Cell Signal.*
66. Seliger, B. and Pfizenmaier, K. (1989) *J.Immunogenet.* **16**, 315-320
67. Drake, C. G., Jaffee, E., and Pardoll, D. M. (2006) *Adv.Immunol.* **90**, 51-81
68. Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., Chen, L., and Zou, W. (2004) *Nat.Med.* **10**, 942-949

69. Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K., and Flavell, R. A. (2006) *Annu.Rev.Immunol.* **24**, 99-146
70. Thomas, D. A. and Massague, J. (2005) *Cancer Cell* **8**, 369-380
71. Mellor, A. L. and Munn, D. H. (2000) *Annu.Rev.Immunol.* **18**, 367-391
72. Munn, D. H., Zhou, M., Attwood, J. T., Bondarev, I., Conway, S. J., Marshall, B., Brown, C., and Mellor, A. L. (1998) *Science* **281**, 1191-1193
73. Korman, A. J., Peggs, K. S., and Allison, J. P. (2006) *Adv.Immunol.* **90**, 297-339
74. Perez, V. L., Van Parijs, L., Biuckians, A., Zheng, X. X., Strom, T. B., and Abbas, A. K. (1997) *Immunity*. **6**, 411-417
75. Blank, C., Gajewski, T. F., and Mackensen, A. (2005) *Cancer Immunol.Immunother.* **54**, 307-314
76. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., and Honjo, T. (1992) *EMBO J.* **11**, 3887-3895
77. Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., Stringaro, A., Molinari, A., Arancia, G., Gentile, M., Parmiani, G., and Fais, S. (2002) *J.Exp.Med.* **195**, 1303-1316
78. Giovarelli, M., Musiani, P., Garotta, G., Ebner, R., Di Carlo, E., Kim, Y., Cappello, P., Rigamonti, L., Bernabei, P., Novelli, F., Modesti, A., Coletti, A., Ferrie, A. K., Lollini, P. L., Ruben, S., Salcedo, T., and Forni, G. (1999) *J.Immunol.* **163**, 4886-4893
79. Ellerhorst, J., Nguyen, T., Cooper, D. N., Lotan, D., and Lotan, R. (1999) *Int.J.Oncol.* **14**, 217-224
80. Hittlet, A., Legendre, H., Nagy, N., Bronckart, Y., Pector, J. C., Salmon, I., Yeaton, P., Gabius, H. J., Kiss, R., and Camby, I. (2003) *Int.J.Cancer* **103**, 370-379
81. van den Brule, F. A., Buicu, C., Baldet, M., Sobel, M. E., Cooper, D. N., Marschal, P., and Castronovo, V. (1995) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **209**, 760-767
82. Camby, I., Belot, N., Rorive, S., Lefranc, F., Maurage, C. A., Lahm, H., Kaltner, H., Hadari, Y., Ruchoux, M. M., Brotchi, J., Zick, Y., Salmon, I., Gabius, H. J., and Kiss, R. (2001) *Brain Pathol.* **11**, 12-26
83. Rorive, S., Belot, N., Decaestecker, C., Lefranc, F., Gordower, L., Micik, S., Maurage, C. A., Kaltner, H., Ruchoux, M. M., Danguy, A., Gabius, H. J., Salmon, I., Kiss, R., and Camby, I. (2001) *Glia* **33**, 241-255
84. Raz, A. and Lotan, R. (1987) *Cancer Metastasis Rev.* **6**, 433-452

85. Grassadonia, A., Tinari, N., Iurisci, I., Piccolo, E., Cumashi, A., Innominato, P., D'Egidio, M., Natoli, C., Piantelli, M., and Iacobelli, S. (2004) *Glycoconj.J.* **19**, 551-556
86. Juszczynski, P., Ouyang, J., Monti, S., Rodig, S. J., Takeyama, K., Abramson, J., Chen, W., Kutok, J. L., Rabinovich, G. A., and Shipp, M. A. (2007) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**, 13134-13139
87. Rubinstein, N., Alvarez, M., Zwirner, N. W., Toscano, M. A., Ilarregui, J. M., Bravo, A., Mordoh, J., Fainboim, L., Podhajcer, O. L., and Rabinovich, G. A. (2004) *Cancer Cell* **5**, 241-251
88. Mathieu, V., Le Mercier, M., De Neve, N., Sauvage, S., Gras, T., Roland, I., Lefranc, F., and Kiss, R. (2007) *J.Invest Dermatol.* **127**, 2399-2410
89. Le, Q. T., Shi, G., Cao, H., Nelson, D. W., Wang, Y., Chen, E. Y., Zhao, S., Kong, C., Richardson, D., O'Byrne, K. J., Giaccia, A. J., and Koong, A. C. (2005) *J.Clin.Oncol.* **23**, 8932-8941
90. Thijssen, V. L., Postel, R., Brandwijk, R. J., Dings, R. P., Nesmelova, I., Satijn, S., Verhofstad, N., Nakabeppu, Y., Baum, L. G., Bakkers, J., Mayo, K. H., Poirier, F., and Griffioen, A. W. (2006) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **103**, 15975-15980
91. Williams, B. L., Schreiber, K. L., Zhang, W., Wange, R. L., Samelson, L. E., Leibson, P. J., and Abraham, R. T. (1998) *Mol.Cell Biol.* **18**, 1388-1399
92. Straus, D. B. and Weiss, A. (1992) *Cell* **70**, 585-593
93. Fajka-Boja, R., Szemes, M., Ion, G., Legradi, A., Caron, M., and Monostori, E. (2002) *Immunol.Lett.* **82**, 149-154
94. Kovacs, G. L., Stelkovics, E., Krenacs, L., Gonda, G., Goth, M., Kovacs, L., Gorombey, Z., Hubina, E., and Szabolcs, I. (2005) *Endocrine.* **26**, 41-44
95. Fajka-Boja, R., Szemes, M., Ion, G., Legradi, A., Caron, M., and Monostori, E. (2002) *Immunol.Lett.* **82**, 149-154
96. Fajka-Boja, R., Blasko, A., Kovacs-Solyom, F., Szebeni, G. J., Toth, G. K., and Monostori, E. (2008) *Cell Mol.Life Sci.* **65**, 2586-2593
97. Ion, G., Fajka-Boja, R., Toth, G. K., Caron, M., and Monostori, E. (2005) *Cell Death.Differ.* **12**, 1145-1147
98. Ion, G., Fajka-Boja, R., Kovacs, F., Szebeni, G., Gombos, I., Czibula, A., Matko, J., and Monostori, E. (2006) *Cell Signal.*
99. Williams, B. L., Schreiber, K. L., Zhang, W., Wange, R. L., Samelson, L. E., Leibson, P. J., and Abraham, R. T. (1998) *Mol.Cell Biol.* **18**, 1388-1399
100. Straus, D. B. and Weiss, A. (1992) *Cell* **70**, 585-593

101. Fajka-Boja, R., Szemes, M., Ion, G., Legradi, A., Caron, M., and Monostori, E. (2002) *Immunol.Lett.* **82**, 149-154
102. Hernandez, J. D., Nguyen, J. T., He, J., Wang, W., Ardman, B., Green, J. M., Fukuda, M., and Baum, L. G. (2006) *J.Immunol.* **177**, 5328-5336
103. Walzel, H., Blach, M., Hirabayashi, J., Kasai, K. I., and Brock, J. (2000) *Glycobiology* **10**, 131-140
104. Pace, K. E., Hahn, H. P., Pang, M., Nguyen, J. T., and Baum, L. G. (2000) *J.Immunol.* **165**, 2331-2334
105. Fajka-Boja, R., Blasko, A., Kovacs-Solyom, F., Szebeni, G. J., Toth, G. K., and Monostori, E. (2008) *Cell Mol.Life Sci.* **65**, 2586-2593
106. Hsu, D. K., Yang, R. Y., and Liu, F. T. (2006) *Methods Enzymol.* **417**, 256-273
107. He, J. and Baum, L. G. (2004) *J.Biol.Chem.* **279**, 4705-4712
108. Hahn, H. P., Pang, M., He, J., Hernandez, J. D., Yang, R. Y., Li, L. Y., Wang, X., Liu, F. T., and Baum, L. G. (2004) *Cell Death.Differ.* **11**, 1277-1286
109. Rubinstein, N., Alvarez, M., Zwirner, N. W., Toscano, M. A., Ilarregui, J. M., Bravo, A., Mordoh, J., Fainboim, L., Podhajcer, O. L., and Rabinovich, G. A. (2004) *Cancer Cell* **5**, 241-251
110. Mathieu, V., Le Mercier, M., De Neve, N., Sauvage, S., Gras, T., Roland, I., Lefranc, F., and Kiss, R. (2007) *J.Invest Dermatol.* **127**, 2399-2410
111. Gastman, B. R., Yin, X. M., Johnson, D. E., Wieckowski, E., Wang, G. Q., Watkins, S. C., and Rabinowich, H. (2000) *Cancer Res.* **60**, 6811-6817
112. Gillenwater, A., Xu, X. C., el Naggat, A. K., Clayman, G. L., and Lotan, R. (1996) *Head Neck* **18**, 422-432
113. Ion, G., Fajka-Boja, R., Toth, G. K., Caron, M., and Monostori, E. (2005) *Cell Death.Differ.* **12**, 1145-1147
114. Ion, G., Fajka-Boja, R., Kovacs, F., Szebeni, G., Gombos, I., Czibula, A., Matko, J., and Monostori, E. (2006) *Cell Signal.*
115. Kiss, J., Kunstar, A., Fajka-Boja, R., Dudics, V., Tovari, J., Legradi, A., Monostori, E., and Uher, F. (2007) *Exp.Hematol.* **35**, 305-313
116. Norling, L. V., Sampaio, A. L., Cooper, D., and Perretti, M. (2008) *FASEB J.* **22**, 682-690

A DISSZERTÁCIÓ ANYAGÁT ADÓ, VAGY AHHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

FERENC KOVÁCS-SÓLYOM, ANDREA BLASKÓ, RÓBERT KATONA,
LÁSZLÓ KRENÁCS¹, ROBERTA FAJKA-BOJA, GÁBOR JÁNOS SZEZENI, LEA
VÉGH, FERENC UHER², VILMOS TUBAK³, ROBERT KISS⁴, ÉVA
MONOSTORI

Galectin-1 is the key effector molecule in T-cell apoptosis induced by different
galectin-1 expressing tumor cells.

Kézirat, a J Cell Mol Med folyóiratba küldendő IF: 6.807

GABRIELA ION, ROBERTA FAJKA-BOJA, **FERENC KOVÁCS**, GÁBOR
SZEZENI, IMRE GOMBOS, ÁGNES CZIBULA, JÁNOS MATKÓ, ÉVA
MONOSTORI

Acid sphingomyelinase mediated release of ceramid is essential to trigger the
mitochondrial pathway of apoptosis by galectin-1.

CELL SIGNAL **18**, 1887-96 (2006)

IF: 4.887

ROBERTA FAJKA-BOJA, ANDREA BLASKÓ, FERENC **KOVÁCS-SÓLYOM**,
GÁBOR J. SZEZENI, GÁBOR K. TÓTH, ÉVA MONOSTORI

Co-localization of galectin-1 with GM1 ganglioside in the course of its clathrin-
and raft-dependent endocytosis.

CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 2008 65(16):2586-93

IF: 5.239

Konferencia előadások és poszterek

Kovács-Sólyom Ferenc, Tubak Vilmos, Monostori Éva: Tumorsejtek által termelt
galektin-1 T sejtekre gyakorolt citotoxikus hatása. VII. Magyar Genetikai
Kongresszus/ XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, 2007. április 15-
17. előadás

Ferenc Kovács-Sólyom, Andrea Blaskó, Gábor János Szezeni, Vilmos Tubak ,
László Krenács, Roberta Fajka-Boja, Lea Vég, Éva Monostori: The role of galectin-1
in the war of tumor cells against T cells. Straub-napok, MTA SZBK, Szeged, 2007.
november 28-30. előadás

Kovács-Sólyom Ferenc, Blaskó Andrea, Szezeni Gábor János, Tubak Vilmos,
Krenács László, Fajka-Boja Roberta, Vég Lea, Monostori Éva :
A galektin-1, mint legfőbb effektor molekula az U87 glioblasztóma által indukált T
sejt apoptózisban.

Magyar Immunológiai Társaság Vándorgyűlése, Budapest, 2008. 10.29-31. előadás

Kovács-Sólyom Ferenc, Blaskó Andrea, Katona Róbert, Szebeni Gábor János, Krenács László, Végh Lea, Fajka-Boja Roberta, Tubak Vilmos, Robert Kiss, Monostori Éva. A galektin-1, mint legfőbb effektor molekula az U87 glioblasztóma által indukált T sejt apoptózisban. (poster) Membrán-transzport konferencia Sümeg 2008 máj. 20-23. **Előadásként kiválasztva a legjobb 6 munka között.**

Blaskó Andrea, **Kovács-Sólyom Ferenc**, Fajka-Boja Roberta, Uher Ferenc, Monostori Éva. A mesenchymalis őssejtek által termelt galektin-1 aktivált T-sejtek apoptózisát okozza. (poster) Membrán-transzport konferencia Sümeg 2008 máj. 20-23.

Fajka-Boja Roberta, Blaskó Andrea, **Kovács-Sólyom Ferenc**, Szebeni Gábor János, Tóth K. Gábor, Monostori Éva A galektin-1 klatrin- és raft-függő endocitózisa. (poster) Membrán-transzport konferencia Sümeg 2008 máj. 20-23.

Kovács F, Tubak V, Monostori É: Rákos sejtek által termelt galektin-1 T sejtekre gyakorolt citotoxikus hatása. (Poster) Membrán-transzport konferencia Sümeg 2006 máj. 23-26.

ÖSSZEFOGLALÁS

A galektin fehérjecsalád a lektinek közé tartozik, melyek legfőbb jellemzője, hogy szénhidrátkötő domainjük révén sejtfelszíni glikokonjugátumokhoz kötődnek. Ez idáig tizenöt különböző galektin molekulát azonosítottak, melyeket a nagyfokú szekvencia homológia és a β -galaktozidokat felismerő tulajdonság alapján soroltak egy csoportba. Az állatvilágban széles körben elterjedt fehérjék, gerinctelen (szivacsok, férgek) és gerinces állatokban (halak, kételtűek, madarak, emlősök) egyaránt előfordulnak.

Ezen család legkorábban felfedezett és legjobban jellemzett tagja a galektin-1, amely egy 14kDa molekulatömegű, egy szénhidrátkötő domainnel rendelkező (prototípus) fehérje. A galektin-1 az ideg- és izomszövetben, vesében, tüdőben, méhlepényben, az elsődleges (tímusz, csontvelő) és másodlagos (lép, nyirokcsomók) limfoid szervekben termelődik. A fehérje N és C terminális szakasza homodimer kialakítását teszi lehetővé. A sejtfelszíni, valamint az extracelluláris mátrixban előforduló glikozilált fehérjékhez kötődve, a molekula befolyásolja a sejtadhéziót, valamint szignál transzdukciós utakat indít be.

A galektin-1 *in vivo* is szerepet játszik T sejtek funkciójának szabályozásában. Például a regulátoros T sejtek (Treg), amelyek az immunválasz befejezésében és gátlásában vesznek részt, galektin-1-et termelnek, melynek hiánya a Treg sejtek funkciójának sérülését eredményezi.

Az irodalmi adatok és csoportunk kísérleti eredményei alapján megfogalmazott munkahipotézis szerint a tumorsejtek által termelt és a sejtmembránon prezentált galektin-1 is indukálhatja a T sejtek apoptózist, így hozzájárul a tumor immunprivilegium kialakításához. A jelenség vizsgálatához egy *in vitro* tesztrendszer dolgoztunk ki, amelyben a galektin-1-et expresszáló tumorsejteket a modellként használt Jurkat leukémiás T sejtekkel tartottuk egy kultúrában. A Jurkat sejtekről korábban kimutattuk, hogy érzékenyek a galektin-1 által indukált apoptózisra. A kultúra rendszerben az apoptózist fluoreszcens festékkel konjugált AnnexinV jelöléssel detektáltuk.

A vizsgálatokhoz különböző galektin-1-et termelő melanóma és glióma sejtvonalakat használtunk, negatív kontrollként HeLa sejteket alkalmaztunk, melyek nem expresszálják ezt a fehérjét. A protein jelenlétét áramlási citometriával és

Western blot technikával ellenőriztük. Az ko-kultúra assay lényege, hogy a melanóma, glióma illetve a HeLa sejteket egy kultúrában inkubáljuk a T sejtekkel, 16 óra után mikroszkópiás módszerrel vizsgáltuk a bekövetkezett apoptózist. A mennyiségi összehasonlítást a T sejtek megszámlálásával végeztük, megadtuk az apoptózist szenvedett T sejtek arányát az összes T sejthez képest.

Az eredmények azt mutatják, hogy a galektin-1 fehérjét expresszáló tumorsejtek a velük ko-kultúrában tartott T sejtek hozzávetőlegesen 30%-ának apoptózist indukálják, szemben az apoptózist nem okozó galektin-1 negatív HeLa sejtekkel. A perifériás vérből izolált, majd aktivált T sejtekkel a Jurkat sejtekhez hasonló eredményt kaptunk. A folyamat részletes vizsgálatához az U87 glioblasztóma sejt vonalat választottuk, szembeállítva a HeLa sejtekkel kapott eredményekkel.

A galektin-1 meghatározó szerepének igazolására a tumor sejt indukálta T sejt apoptózisban különböző megközelítéseket választottunk.

Első lépésként a galektin-1 cDNS-ével transzfektált HeLa sejtek szelekciója és klónozása során különböző mennyiségű galektin-1 fehérjét prezentáló HeLa sejt vonalat állítottunk elő. Ezen sejt vonalakkal végzett ko-kultúra kísérletek során megállapítottuk, hogy a galektin-1 központi szerepet játszik a T sejt apoptózis indukcióban, hiszen az eltérő mennyiségű galektin-1 expresszió arányosan különböző mértékű apoptózist váltott ki. A nagyobb mennyiségű galektin-1 termelés magasabb arányú T sejt apoptózissal járt együtt, míg a vad típusú HeLa sejtek a háttér 5-8% T sejt apoptózis értéket mutatták. Hasonló eredményt kaptunk, mikor a HeLa sejtekhez rekombináns galektin-1-et adtunk. A tumor sejtek a felszínükre kötődött galektin-1 mennyiségétől függő T sejt apoptózist váltottak ki.

Másik oldalról megközelítve a kérdést, a nagy mennyiségű galektin-1-et termelő U87 glioblasztóma sejteket két siRNA konstrukciót hordozó vektorral transzfektáltuk, a galektin-1 gén csendesítése érdekében. A galektin-1-et legalacsonyabb szinten expresszáló U87 sejt vonalat választottuk ko-kultúra kísérletekhez, melyek egyértelműen megmutatták, hogy a csökkent galektin-1 termelés szignifikánsan alacsonyabb arányú T sejt apoptózist eredményez, összehasonlítva a vad típusú, vagy a scrambled RNA-sel transzfektált U87 sejtek által indukált apoptózissal.

A sejt felszíni galektin-1 mennyisége laktóz kezeléssel is csökkenthető, mivel a laktóz molekula a galektin-1 szénhidrátkötő domainjéhez kötődik, így nagy moláris feleslegben alkalmazva kompetícióba lép a sejt felszíni cukor oldalláncokkal, ezáltal

eltávolítja a galektin-1-et a sejtfelszínről. A kísérleteket egy laktóz analóggal, a thiodigalaktoziddal (TDG) végeztük és megállapítottuk, hogy a TDG-kezelt U87 sejtek kevesebb T sejt apoptózist okoztak szemben a kezelésem át nem esett glioblasztóma sejtekkel. Ezek a kísérletek egyértelműen bizonyítják, hogy az apoptózis indukcióban a galektin-1 proteinnek kulcsfontosságú szerepe van.

Megvizsgáltuk, hogy a galektin-1 által mediált T sejt apoptózis milyen mechanizmussal történik és összevethető-e a csoportunk által korábban vizsgált rekombináns galektin-1 kiváltotta sejthalál egyes lépéseivel.

Ha a különböző galektin-1 fehérjét expresszáló sejtvonalak kondicionált médiumát T sejtekhez adjuk, nem tapasztalunk apoptózist, szemben a pozitív kontrollként alkalmazott rekombináns galektin-1 hatásával. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a galektin-1 nincs jelen a sejtek felülűsójában (amit ELISA kísérletek is alátámasztanak –nem közölt adat-). Transwell kísérletek is ezt támasztják alá, mivel ha a két sejttípust féligáteresztő hártyával fizikailag elválasztjuk, ami a tenyésztő folyadék szabad áramlását lehetővé teszi, nem tapasztalunk T sejt apoptózist. Konfokális mikroszkópos vizsgálat során megfigyelhető, hogy a T sejtek és a glióma sejtek fizikai kölcsönhatásba lépnek egymással, melynek során az U87 glióma sejtek által a sejtfelszínen prezentált galektin-1 átkerül a T sejtekre és azok apoptózist okozza. Áramlási citometriás mérések kimutatták, hogy a T sejtek felszínén a galektin-1 mennyisége az U87 sejtekkel történt együtt inkubáció hosszával arányosan nő. A galektin-1 tehát nem szolúbilis faktorként fejt ki apoptózis indukáló hatását, hanem sejtmembránhoz kötött formában, közvetlen sejt-sejt kölcsönhatás során hat.

Munkánk során összehasonlítottuk a szolúbilis, rekombináns galektin-1 által és a tumorsejt eredetű, membrán-kötött galektin-1 által indukált sejthalál folyamatát. Eredményeink azt mutatják, hogy a főbb lépések hasonlóak. A ko-kultúra rendszerben is kimutattuk a foszfatidil-szerin molekula transzlokációját a T sejtek membránjának extracelluláris oldalára, a mitokondrium membrán-potenciáljának csökkenését JC-1 jelöléssel. A p56^{lck} és ZAP70 kinázok szerepét hiányos sejtekkel végzett kísérletekkel bizonyítottuk. Korábbi eredményeink igazolják, hogy ezen kinázok nélkülözhetetlenek a galektin-1 közvetítette programozott sejthalál szignál transzdukciója során. Az említett két kináz hiányos sejtvonal tehát nem érzékeny a galektin-1 mediált apoptózisra. Végül, kimutattuk a kaszpáz kaszkád aktiválódását is

a sejt eredetű galektin-1 hatására, mely szintén összhangban van a rekombináns galektin-1-gyel kapott eredményekkel.

Munkánk során megvizsgáltuk, hogy a különböző tumorsejtek által termelt, szekretált, majd a sejtfelszíni glikozilált molekulákhoz kötődött galektin-1 a rekombináns fehérjéhez hasonlóan aktivált T sejtek, valamint aktivált fenotípusú leukémiás T sejtek apoptózisát indukálja. A fehérje ebben a rendszerben membránhoz kötött formában hat, közvetlen, fizikai sejt-sejt kölcsönhatás során kerül át a galektin-1-et expresszáló tumorsejt felszínéről a T sejtre. A protein által ilyen módon beindított programozott sejthalál folyamatának egyes lépései megegyeznek a rekombináns fehérje által indukált apoptóziséval.

Eredményeink összhangban vannak a szakirodalomban megjelent publikációkéval. Linda Baum és munkatársai kimutatták, hogy a szilárd fázishoz kötött rekombináns galektin-1 is képes kiváltani T sejtek apoptózisát. Hannah Rabinovich csoportja fejnyak karcinóma sejteket inkubált egy kultúrában Jurkat T sejtekkel és a kísérlet során T sejt apoptózist tapasztaltak, amit szolúbilis Fas ligand váltott ki. Több közlemény jelent meg arról, hogy a galektin-1 részt vesz a tumor immunprivilegium kialakításában. Eredményeink szerint ezt a tumorszövetbe infiltrálódó T sejtek apoptózisának indukciójával valósítja meg.

SUMMARY

Galectins are a family of lectins with one or two carbohydrate recognition domains (CRD) which recognize glycoconjugates on the cell surface or extracellular matrix glycoproteins. By time fifteen different galectins have been identified and grouped in the same family based on high sequence homology and β -galactoside recognizing feature. Members of galectin are commonly expressed in the animal kingdom including invertebrates (sponges, worms) and in vertebrates (fishes, amphibians, reptiles, birds, mammals) as well.

Galectin-1 a 14 kDa protein containing one CRD is the first family member described and characterized. It is expressed in neuronal and muscle tissue, in kidney, lung and placenta, in primary (thymus, bone marrow) and secondary (spleen, lymph nodes) lymphoid organs. N and C termini of the protein compose dimerization motifs therefore two galectin-1 molecules are able to form a homodimer. Galectin-1 can bind to glycosylated residues present on the cell surface or the extracellular matrix proteins influencing cell adhesion processes and initiating signal transduction pathways.

In vivo galectin-1 plays an important role in the regulation of T cell function. For example Regulatory T cells (Treg) involved in termination and inhibition of the immune response, express galectin-1. Lack of this protein results in the deficient function of Tregs.

Based on literature data and results of our earlier experiments, we have formed the following working hypothesis: galectin-1 produced by tumor cells and presented on the cell surface can also induce T cell apoptosis contributing to generate tumor immune privilege. To investigate this phenomenon we have developed an *ex vivo* system in which galectin-1 expressing tumor cells are incubated in the same culture with Jurkat leukemic T cells used as model lymphocytes. Previously we have proved that Jurkat T cells are sensitive to galectin-1 induced apoptosis when galectin-1 is added in soluble form. Similarly tumor-cell bound galectin-1 triggers T cell death when these cells are co-cultured.

In these experiments we used different melanoma and glioma cell lines producing galectin-1. HeLa human cervix carcinoma cells which did not express galectin-1 were used as a negative control. Galectin-1 expression was analyzed by Western blot (total

cellular galectin-1) and flow cytometry (cell surface, secreted galectin-1). U87 glioblastoma cell line was used in the majority of the experiments and T cells were co-cultured for 16 hours and apoptosis was investigated with fluorescent microscopy using Fluorescein labeled AnnexinV. The quantitative comparison was performed by counting T cells and calculating the ratio of apoptotic T cells compared with total T cell number.

The results showed that tumor cells expressing galectin-1 induced apoptosis in 30% of co-cultured T cells, in contrast to galectin-1 negative HeLa cells. T blasts generated by activation of peripheral blood T cells were also analyzed in co-culture experiments and gave similar results to Jurkat cells.

To prove the essential role of galectin-1 in the tumor cell-induced T cell apoptosis we applied different approaches.

At first, we performed HeLa cell transfection with galectin-1 cDNA. After the cloning and selection steps we generated HeLa cell lines expressing different amount of galectin-1. Co-culture experiments were carried out with these galectin-1 transgenic HeLa cells. The ratio of apoptotic T cells showed good correlation with expressed amount of galectin-1 by HeLa cells since higher degree of galectin-1 expression resulted in higher ratio of T cell apoptosis compared to wild type cells and those expressing lower amount of galectin-1. We could conclude that galectin-1 plays central role in the T cell apoptosis induction because the ratio of apoptotic T cells showed good correlation with expressed amount of galectin-1. The extent of T cell apoptosis induced by galectin-1 – labeled tumor cells depended on the amount of cell surface – bound galectin-1.

Another approach was to knock down galectin-1 gene expression in U87 cells. The U87 cells were stably transfected with two different galectin-1 siRNA expressing vectors and the resulting clones were selected for expressing the lowest level of galectin-1. Co-culture assay was carried out with these cell lines and the results verified that knocking down galectin-1 expression caused significantly lower ratio of T cell apoptosis compared to that induced by wild type or U87 cells transfected with scrambled RNA. Not only genetic modification of galectin-1 expression, but chemical (using the minimal ligand of galectin-1, lactose) removal of galectin-1 from cell surface resulted in decreased T cell death.

All of these experiments unambiguously proved that galectin-1 played an essential role in the tumor cell – induced T cell apoptosis.

Although the mechanism of apoptosis triggered by soluble galectin-1 was previously studied in details, it remained unanswered whether cell - derived and cell – bound galectin-1 acted similarly to that of recombinant protein. Hence we compared these events from various points on view.

Supernatants derived from cultured tumor cells did not contain galectin-1 as showed with flow cytometry and ELISA. Conditioned medium harvested from galectin-1 producing tumor cells did not affect T cell viability in contrast to tissues culture medium supplemented with recombinant galectin-1 indicating that galectin-1 was not secreted by cells into the medium. Consequently, cell-cell interaction was required for T cell death induction that was supported by transwell experiments: physical separation of tumor cells from T cells with semi permeable membrane which allowed circulation of soluble factors, T cell apoptosis was not observed. Necessity of direct physical interaction between the two cell types was documented by co focal microscopy as well. During direct contact, galectin-1 presented by U87 on the cell surface Tran located to T cells and induced their apoptosis. These results showed that cell surface bound galectin-1 induced T cell apoptosis by direct cell-cell interaction.

Further molecular mechanism of cell death induced by tumor cell – derived galectin-1 was compared to the process of apoptosis induced by soluble recombinant galectin-1. Our results showed that the main steps were similar: translocation of phosphatidyl-serine to the extracellular side of T cell membrane and decrease of mitochondrial membrane potential occurred in co-culture assay as well. The role of p56^{lck} and ZAP70 kinases was proved using Jurkat cell mutants deficient in these enzymes. These T cell variants were not sensitive for galectin-1 mediated apoptosis. We also detected the activation of caspase cascade induced by tumor cell derived galectin-1 which also harmonized with the results obtained with recombinant galectin-1.

In this work we have shown that different tumor cells expressing galectin-1 induce T cell apoptosis in contrast to tumors not producing galectin-1 . Firm evidence is provided that the major mediator of induction of T cell death is the anti-inflammatory lectin, galectin-1. Generating galectin-1 transgenic HeLa cells (a tumor not expressing

galectin-1) or knocking down galectin-1 expression in the tumor cell line, U87, producing high level of endogenous galectin-1, results in the increase or decrease of induced T cell apoptosis, respectively. Regarding the mechanism of T cell death triggered by tumor cell surface – bound galectin-1 we found that this process requires direct cell-cell interaction, while galectin-1 translocates from tumor cells to T cell. It has also been established that further molecular steps, e.g. necessity of Lck and ZAP70 tyrosine kinases, breakdown of membrane asymmetry, decrease of mitochondrial membrane potential and activation of the caspase cascade, are identical to that caused by soluble galectin-1.

Our results contribute to the better understanding of the development of tumor immune privilege, a major factor in the self defense of the tumors. According to our results galectin-1 accomplishes this effect by inducing apoptosis of T cells infiltrating into the tumor tissue.